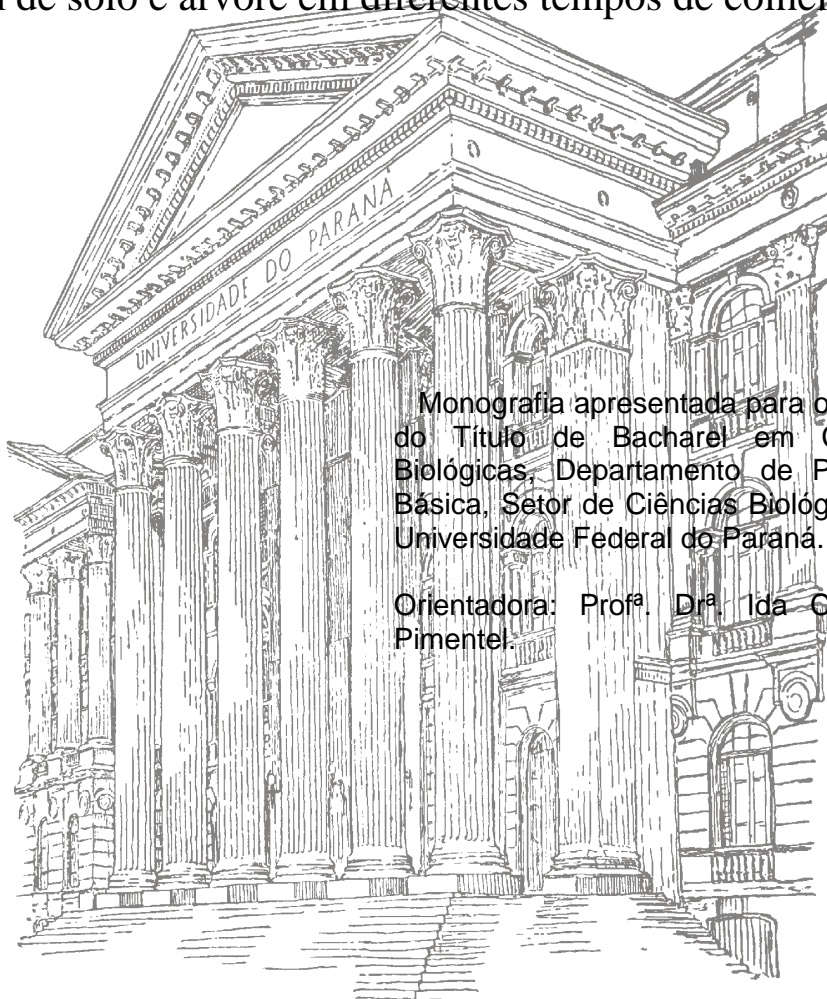


ANGELA BOZZA

Isolamento de fungos associados a grãos de café cv. Iapar 59 de origem de solo e árvore em diferentes tempos de colheita.



Monografia apresentada para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel.

CURITIBA
2007

ANGELA BOZZA

Isolamento de fungos associados a grãos de café cv. Iapar 59 de origem de solo e árvore em diferentes tempos de colheita.

CURITIBA
2007

AGRADECIMENTOS

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, por sempre acreditarem em mim e nunca terem me deixado desistir dos meus sonhos;

À professora, orientadora e amiga, Ida Pimentel, por toda a dedicação e carinho;

À professora Patrícia Dalzoto e professor Dalton Reynaud pelas opiniões e ajudas tão importantes;

Ao meu irmão, Jean Bozza, por sempre estar ao meu lado;

À professora Vânia Vicente e professor Ciro pela colaboração e conselhos;

Ao professor Juarez Gabardo pela realização da análise estatística;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, especialmente à Regina e ao Sérgio;

À Maria Brígida (IAPAR), por toda a paciência;

À Sabina Tralamazza pela amizade e pelo auxílio na realização deste trabalho;

Aos meus amigos do Labmicro: Paulo Marangoni, Mariana Porsani, Diogo Robl, Kaline Feldmann Uhry, Simone Ducci...

Meus amigos da PUC: Aline Brum, Ana Cláudia Fernandes, Francine Potrich, Simone Binda, Cristina Brito, Lísia Pereira, Rodrigo Santos...

Meus amigos da UFPR: Silvia Millan, Melissa Giowanella, Alline Brito, Cibelle Santos, Maria Luíza Araújo, Nédia Ghisi, Rafaela Wasmandorff, Alessandra Boss, Juliana Mattos, Fabrícia, Priscilla Santos...

Obrigada...

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
RESUMO.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
3 REVISÃO LITERÁRIA.....	4
3.1 O CAFÉ.....	4
3.1.1 Cultivo do café.....	5
3.2 FUNGOS ASSOCIADOS AO CAFÉ.....	8
3.3 FATORES CLIMÁTICOS.....	8
3.4 COMPOSTOS ORGÂNICOS.....	9
3.5 QUALIDADE DA BEBIDA.....	10
3.6 MICOTOXINAS.....	11
3.7 DOENÇAS DO CAFEIEIRO.....	13
3.8 PRAGAS DO CAFEIEIRO.....	14
3.9 CAFÉ ARMAZENADO.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	17
4.2 MEIO DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	17
4.2.1 Meio de cultura BDA.....	17
4.2.2 Água peptonada.....	18
4.2.3. Lactofenol de Amann.....	18
4.3 ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	18
4.3.1 Técnica Pour-Plate.....	18
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	19
4.4.1 Técnica do Microcultivo.....	19
4.4.2 Protocolo Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	20
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS DE GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 E AS DIFERENÇAS ENTRE SOLO E ÁRVORE.....	21
5.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS DE GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 E AS DIFERENÇAS ENTRE OS TEMPOS DE COLHEITA.....	24
5.3 FUNGOS ISOLADOS DE GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 E A QUALIDADE DA BEBIDA EM RELAÇÃO À ORIGEM DOS GRÃOS E AOS TEMPOS DE COLHEITA.....	30
5.4 FUNGOS ISOLADOS DE GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 E NÍVEIS DE OCRATOXINA A EM RELAÇÃO À ORIGEM DOS GRÃOS E AOS TEMPOS DE COLHEITA.....	33
6 CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXOS.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 — NÚMERO ABSOLUTO DE GÊNEROS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE E DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005).....	23
TABELA 2 – NÚMERO DE DEFEITOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DO SOLO E DA ÁRVORE DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005).....	31
TABELA 3 – ANÁLISE DOS NÍVEIS DE OCRATOXINA (OTA) DO CAFÉ CV. IAPAR 59 DO SOLO E DA ÁRVORE DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005).....	33

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1 – NÚMERO ABSOLUTO DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE E DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005).....	22
GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE E DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005).....	24
GRÁFICO 3 – NÚMERO ABSOLUTO DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE E DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005).....	25
GRÁFICO 4 – NÚMERO ABSOLUTO DOS MORFOTIPOS DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005) EM RELAÇÃO AOS TEMPOS DE COLHEITA.....	26
GRÁFICO 5 – NÚMERO ABSOLUTO DOS MORFOTIPOS DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005) EM RELAÇÃO AOS TEMPOS DE COLHEITA.....	27
GRÁFICO 6 - PORCENTAGEM DOS MORFOTIPOS DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005).....	28
GRÁFICO 7 - PORCENTAGEM DOS MORFOTIPOS DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA CV. IAPAR 59 DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005).....	29

GRÁFICO 8 – QUALIDADE DA BEBIDA DE CAFÉ DE GRÃOS CV. IAPAR 59 DA
ÁRVORE DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005)..... 30

GRÁFICO 9 – QUALIDADE DA BEBIDA DE CAFÉ DE GRÃOS CV. IAPAR 59 DO
SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005)..... 30

RESUMO

O Brasil vem perdendo espaço no mercado internacional devido à pior qualidade do café, em comparação ao café produzido em outros países. Os principais fatores que alteram a qualidade da bebida são: umidade, temperatura, tipo de solo, pluviosidade e a presença de fungos. As substâncias tóxicas liberadas pelos fungos, além de alterarem a qualidade da bebida, podem também ser prejudiciais à saúde dos consumidores. O objetivo do presente trabalho foi o isolamento de fungos a partir de grãos de café da variedade IAPAR 59, provenientes da cidade de Londrina, Paraná e relacionar estes isolados com a qualidade da bebida e o tempo de permanência desses grãos na árvore ou no solo. Foram realizadas 5 colheitas de grãos da árvore e do solo (safra de 2004/2005), em diferentes tempos (0, 30, 60, 90 e 120 dias). A prova da xícara, para averiguar a qualidade da bebida, e a determinação dos níveis de ocratoxina nos grãos foi realizado no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). O isolamento dos fungos foi feito pelo método “Pour-plate”, em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar). As placas foram incubadas por 4 dias a aproximadamente 28°C. Para a identificação dos fungos foram realizadas as técnicas de Microcultivo e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Houve diferença significativa no número absoluto de fungos encontrados nos grãos da árvore (5393) em relação aos grãos coletados no solo (1523), bem como nos diferentes tempos de colheita. Foram identificados 7 gêneros: *Absidia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces* e *Penicillium*. O morfotipo *Aspergillus* sp1 foi encontrado em maior frequência em grãos originados da árvore e *Aspergillus* sp7, em maior frequência nos grãos originados do solo. A bebida perdeu a qualidade em função do tempo de permanência dos grãos tanto na árvore quanto no solo. O gênero *Aspergillus* pode estar relacionado com a piora na qualidade da bebida. A análise de ocratoxina demonstrou elevados níveis da micotoxina nos grãos de café. Pode-se concluir que para a obtenção de uma bebida de melhor qualidade, deve-se evitar a permanência prolongada dos grãos na árvore e no solo.

Palavras-chave: Qualidade da bebida; IAPAR 59; fungos; *Coffea arabica*.

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio mundial do café engloba, anualmente, recursos que chegam a 91 bilhões de dólares e envolve meio bilhão de pessoas, ou 8% da população mundial. É nesse mercado gigantesco que está centrado o interesse da cadeia produtiva do café brasileiro, que contribuiu com mais de 30% da produção mundial nas últimas safras (EMBRAPA, 2007).

A produção nacional da safra 2006/07 atingiu 42,5 milhões de sacas de 60kg de café beneficiado, sendo 33,0 milhões de arábica e 9,5 milhões de robusta, superior à safra 2005/06 em 29,0%, em razão de um crescimento de 32,9% na produtividade. Esse aumento deveu-se aos bons tratos culturais, incentivados pela recuperação dos preços de mercados, e a bianualidade positiva da cultura (CONAB, 2007).

No Paraná foram produzidas 2,2 milhões de sacas de café beneficiado (100% arábica), significando um crescimento de 56,7% em relação à safra anterior. A produtividade, de 22,41 sacas/ha, foi superior à anterior em 66,1%, devido a bianualidade positiva, a condições climáticas mais favoráveis e a bons tratos culturais. Cabe destacar que o clima seco no período da colheita (abril-setembro) e a modalidade de colheita (no pano) empregada em 63% da produção contribuíram para a obtenção de maior volume de cafés de excelente qualidade, predominando “bebida dura para melhor” (CONAB, 2007).

O gênero *Coffea* apresenta aproximadamente 100 espécies de cafeeiros, mas apenas cinco são cultivados comercialmente e, entre estes, *Coffea arabica* (cafeeiro arábica) e *C. canephora* Pierre (cafeeiro robusta) são os mais comercializados. (CARVALHO et al., 2001).

O tempo de permanência dos frutos no chão está relacionado com o aumento na porcentagem de fungos encontrados no interior dos grãos (KRUG, 1940). Além da presença dos fungos, outros fatores alteram a qualidade da bebida, tais como: umidade, temperatura, altitude, tipo de solo, pluviosidade, estágio do fruto quando a colheita é realizada, processo de fermentação, entre outros, de menor importância. Os fungos alteram a qualidade da

bebida principalmente nos cafés provenientes de varrição, ou seja, aqueles provenientes da amontoa do café caído naturalmente ou derriçado no chão (KRUG, 1947).

As substâncias tóxicas liberadas por vários microrganismos, além de alterarem a qualidade da bebida, podem também ser altamente prejudiciais à saúde dos consumidores. (MILSLIVEC, BRUCA e GIBSON, 1987). A ocratoxina A, substância tóxica que é produzida por várias espécies de fungos (*Aspergillus ochraceus* Sacc e *Penicilium* sp.), tem sido bastante estudada.(STUDER- ROHR, 1994).

Conhecer os fungos e entender como, onde e porque eles crescem é necessário para aqueles que lidam com grãos e sementes armazenados, pois um dos principais requisitos para um bom armazenamento é a prevenção de crescimento de fungos. Esses fungos podem afetar a aparência e a qualidade das sementes e grãos para quase todos os propósitos para os quais sementes e grãos são utilizados (CHRISTENSEN e KAUFMANN, 1969).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Isolar fungos associados aos grãos de café cv. Iapar 59 em diferentes tempos de colheita e diferentes origens.

Objetivos específicos:

- Isolar fungos de café em cinco tempos de colheita;
- Comparar os fungos de origem da árvore e do solo em diferentes tempos de colheita;
- Correlacionar os fungos isolados com a qualidade da bebida e níveis de ocratoxina encontrados.

3. REVISÃO LITERÁRIA

3.1. O café

O Brasil é um dos principais países exportadores de café do mundo. Na safra de 2004/2005 o Brasil produziu 39.272 mil sacas, em uma área de 2.212.870 hectares. O Paraná é o quarto maior produtor de café do país e a produção final na safra de 2004/2005 foi de 2.526 mil sacas. (CONAB, 2005).

Segundo ORMOND (1999), o café foi introduzido no Brasil em 1727, por Francisco Mello Palheta, trazido de sua visita à Guiana Francesa. As primeiras sementes e mudas foram plantadas em Belém (Pará) e em seguida no Maranhão. Em 1760, vieram do Maranhão para o Rio de Janeiro, expandindo-se pela encosta da Serra do Mar e atingindo em 1780, o Vale do Paraíba (São Paulo). A cultura de café *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) foi estabelecida, no Brasil, em 1727 e suas exportações tornaram-se expressivas a partir de 1802, quando se tornou um dos principais produtos de exportação do Brasil (PERIOTO, 2004).

O cultivar cv. IAPAR 59 originou-se do cruzamento entre *Coffea arabica*, Villa Sarchi 971/10 e o Híbrido de Timor 832/2, realizado no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro em Portugal, onde recebeu a denominação de H361. Após bom desempenho nas regiões de Londrina, Loanda e Carlópolis, no estado do Paraná, foi lançada como variedade, passando a receber a denominação de IAPAR 59. A média da produção anual por planta demonstrou que a variedade é altamente competitiva, no mesmo espaçamento, em comparação com as variedades comerciais em uso, com a vantagem de não necessitar tratamentos químicos para o controle da ferrugem. É preferencialmente indicada para regiões mais frias e chuvosas, por amadurecer mais precoce e uniformemente que Catuaí, antecipando a colheita e escapando do dano das geadas precoces sobre frutos verdes. Deve ser plantada preferencialmente em partes altas da propriedade, onde o calor e a geada são menos intensos (IAPAR, 2007).

As plantas de café são arbustos de até 4 metros de altura, caule reto de casca cinzenta e rugosa. Copa cônica com ramos laterais pendentes. As folhas são onduladas nos bordos e de coloração verde-acinzentada quando jovens e tornando-se verde-brilhante

posteriormente. Possuem flores brancas aglomeradas ao longo dos ramos, aromáticas e atrativas para abelhas (BIBVIRT, 2004). Possuem frutos com formas ovóides, verde passando a vermelho e tornando-se preto de acordo com as fases de maturação. A casca é lisa brilhante, contendo grãos de coloração acinzentada, branco-amarelada ou amarelo-esverdeada, envoltas por polpa branca, adocicada (BIBVIRT, 2004).

Sabe-se que há diferenças na qualidade do café entre as espécies, sendo que o café arábica possui melhor qualidade, com concentrações mais elevadas de carboidratos, lipídeos e compostos orgânicos, a exemplo da trigonelina. Já os cafés robustos, considerados bebida neutra, possuem maiores teores de cafeína e compostos fenólicos (ILLY e VIANI, 1995).

Devido à importância do café nas exportações brasileiras, foi criado, em 1931, o Conselho Nacional do Café (CNC), que, em 1933, foi substituído pelo Departamento Nacional de Café (DNC). Em 1952, foi criado o Instituto Brasileiro do Café (IBC), formado principalmente por cafeicultores, que definiu as diretrizes da política cafeeira até 1989. Após a extinção do IBC, foi criado, em 1996, pelo Governo Federal, o Conselho Deliberativo de Política do Café (CDPC), vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Este tem a finalidade de formular as políticas públicas concernentes à produção, comercialização, exportação e marketing, bem como de estabelecer um programa de pesquisa agrônômica e mercadológica para dar suporte técnico e comercial ao desenvolvimento da cadeia agroindustrial do café (EMBRAPA, 2007).

3.1.1. Cultivo do café

Segundo o Manual de Recomendações do Instituto Brasileiro do Café (IBC/GERCA, 1981), os frutos destinados à produção de sementes devem ser colhidos maduros, no estado “cereja”. Os frutos selecionados deverão ser despulpados, degomados e muito bem lavados. As sementes devem ser secas, de preferência à sombra, e apresentar teor de umidade ao redor de 12%. As sementes preparadas devem ser semeadas em menos de 6 meses após sua colheita, pois a partir desse período perdem rapidamente o poder germinativo.

Segundo ORMOND (1999), existem três sistemas de plantio de café: tradicional, em renque e adensado. O sistema tradicional é o predominante no parque cafeeiro nacional.

As lavouras são plantadas com espaçamentos de 3 a 4 metros entre as fileiras e de dois a 2,5 metros entre as covas. Em cada cova são plantadas duas mudas. Esse sistema demanda baixo investimento na implantação, permite livre crescimento das plantas e não exige podas periódicas. Além disso, possibilita facilidade na colheita e melhor qualidade do café colhido. No entanto, apesar das vantagens, apresenta baixa produtividade média.

O sistema em renque utiliza somente uma muda por cova e é indicado para terrenos com topografia que permita mecanização. Quase todas as lavouras do cerrado o adotam. O espaçamento entre fileiras varia de 3 a 4 metros e a distância entre as mudas é de 0,5 a 1,0 metro. Tem como vantagem a redução dos custos em função da mecanização dos tratos culturais. Obtêm-se bons níveis de produtividade e boa qualidade do café colhido (ORMOND, 1999).

O sistema adensado é o mais usado nas novas plantações, permitindo elevados níveis de produtividade, especialmente nas primeiras safras. O espaçamento mais adequado nesse caso é de 2 metros entre fileiras e de 0,5 a 1,0 metro entre plantas, quatro a cinco vezes mais que o sistema tradicional. O plantio adensado utiliza melhor a área disponível, principalmente em pequenas lavouras ou em regiões montanhosas, onde os tratos culturais são realizados manualmente (ORMOND, 1999).

A escolha da época para colheita é fundamental. Se os frutos não estiverem maduros, os grãos não estarão plenamente desenvolvidos ou amadurecidos em seu interior e não amadurecerão após serem colhidos. Se os frutos estiverem maduros demais, os grãos estragarão e basta um grão estragado numa saca para contaminar o restante, alterando o sabor (PETTIGREW, 1999).

Segundo ORMOND (1999), a colheita pode ser feita nas seguintes formas: derriça no chão, em que o café é derrubado no chão, recolhido e abanado, processo no qual é grande a presença de impurezas como paus, folhas, torrões e pedras; derriça no pano, quando os frutos são derrubados num pano ou plástico colocado sob o cafeeiro para evitar que entrem em contato com a terra, diminuindo assim, a presença de impurezas e a mistura com os grãos caídos no chão; colheita a dedo, em que os frutos são colhidos um a um e colocados em cestos, operação que permite colher somente os maduros, possibilitando melhor qualidade do café colhido; e colheita mecânica, na qual o café é colhido com o uso de máquinas colheitadeiras, sistema que é mais utilizado em áreas planas. Como os frutos

amadurecem em tempos diferentes, o melhor método para se obter uma bebida de boa qualidade é a colheita a dedo, na qual os apanhadores colhem apenas os grãos maduros e então voltam ao mesmo arbusto a cada dez dias.

Uma vez colhidas, as cerejas são submetidas a diversas operações para retirada dos grãos. Existem duas tecnologias para obtenção do grão descascado: a via seca e a via úmida (CLARKE e MACRAE, 1985). Por via seca, os frutos são espalhados ao sol por três a quatro semanas e rastelados de vez em quando para serem revolidos, a fim de garantir secagem uniforme. Durante esse período ocorrem fermentações naturais por microrganismos, a polpa ou mucilagem é degradada e o exocarpo torna-se quebradiço (café “coco”), permitindo separar os grãos da casca através da passagem dos mesmos por peneiras vibratórias e ventilação (BEUX, 2004).

O processo por via seca predomina na cafeicultura brasileira e proporciona bebida mais encorpada e menos ácida, devido à migração dos açúcares da polpa para o grão durante a secagem, porém considerada de qualidade inferior à obtida por via úmida (MACHADO, 2002).

Por via úmida, após a colheita, as cerejas são lavadas em água corrente e despulpadas mecanicamente. Os grãos são imersos em água por até 36 horas, sendo fermentados naturalmente. Posteriormente são lavados e secos ao sol. Essa metodologia é mais cara e requer grandes volumes de água, no entanto origina bebida de melhor qualidade (PETTIGREW, 1999).

Depois que os grãos foram removidos dos frutos, por um dos dois métodos, ainda resta uma película muito fina que também deve secar para que os mesmos possam ser armazenados. Os grãos são espalhados ao sol durante 14 dias ou depositados em bandejas e secos artificialmente para a obtenção do “café pergaminho”. Esse pode ser estocado por até um ano em sacos de juta ou outra fibra natural, desde que sejam mantidas em condições adequadas de temperatura e umidade relativa do ar (BEUX, 2004).

Os grãos expostos ao sol, e lugar arejado, secam rapidamente originando bebida de melhor qualidade. Já os que permanecem muitos dias no terreiro sem secar favorecem o desenvolvimento de microrganismos (LUNA-FILHO, 2003).

Antes de serem exportados, o “pergaminho” é removido por máquinas e os grãos são submetidos ao polimento para apresentar aparência brilhante e coloração azulada (PETTIGREW, 1999).

3.2. Fungos associados ao café

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos, aclorofilados e quimiotróficos, obtendo energia através de reações químicas, nas quais substratos adequados são oxidados (TORTORA et al., 2005). A porção do micélio que penetra no substrato e é responsável pela absorção de água e nutrientes é o micélio vegetativo; a porção projetada acima do substrato é o micélio aéreo, também denominado de micélio reprodutivo, pois a partir dessa porção são originados os corpos de frutificação portadores dos conídios (KONEMAN e ROBERTS, 2001).

Ubíquos, são encontrados no ar, no solo, na água, nos vegetais e nos animais. Formam grupo complexo e divergente de microrganismos constituídos por centenas de espécies (APHA, 2001).

Os fungos têm notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições extremamente variáveis como a umidade, temperatura, pH, taxa de oxigenação, período de armazenamento, condições físicas dos grãos e infecção por insetos, entre outras (LAZZARI, 1997).

As espécies de fungos encontradas com maior frequência em cafés brasileiros pertencem aos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Rhizopus* e *Mucor* (KRUG, 1940; WOSIACK, 1971; CHALFOUN e CARVALHO, 1989; MEIRELLES, 1990; ALVES, 1996; FREITA, 2000; BATISTA, 2000).

AESCHBACH (2004), isolando fungos do café da variedade Iapar 59 encontrou além de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*, também os gêneros *Trichoderma*, *Botrytis* e *Drechslera*.

3.3. Fatores climáticos

Os fatores climáticos estão fortemente relacionados à produtividade da lavoura cafeeira. O melhor clima para a cultura do café é aquele em que durante a época da florada dos cafezais a chuva é intensa, favorecendo a brotação dos frutos, e durante a época de colheita a chuva é escassa, impedindo que os fungos fermentem os grãos, o que garante um processo de maturação mais longo. Além disso, temperaturas inferiores a 18°C para o café

arábica provocam uma baixa diferenciação floral, o que prejudica a produtividade. A identificação das condições climáticas de uma região permite encontrar zonas homogêneas para a cultura do café. Existem 3 classes de aptidão climática: apta, quando as condições térmicas e hídricas são favoráveis à cafeicultura; restrita, quando a região possui restrição térmica ou hídrica; e inapta, quando as condições térmicas e hídricas não são favoráveis à cafeicultura (EVANGELISTA et al., 2002).

A pluviosidade é um fator determinante para o desenvolvimento dos grãos de café. As chuvas geralmente coincidem com a fase de expansão dos grãos, que ocorre no período de novembro a fevereiro. Nas outras épocas do ano, uma complementação com irrigação artificial se faz necessária, devido à menor intensidade das chuvas. O tamanho do fruto é sensível ao déficit hídrico, sendo que o tamanho final do grão cereja depende diretamente da precipitação ocorrida no período de 10- 17 semanas após o florescimento. Este período é conhecido como período de expansão máxima dos frutos. A deficiência hídrica pode ser benéfica apenas no período correspondente à dormência dos botões florais, entre os meses de julho e setembro, uma vez que condiciona um florescimento abundante após chuvas ou irrigações no final da fase, provocando frutificação e maturação uniformes na safra seguinte (KARASAWA et al., 2002).

3.4. Compostos orgânicos

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de relacionar os componentes químicos e físico-químicos do grão e a qualidade do café, com o intuito de substituir as dificuldades das provas de xícara por testes mais simples e precisos (AMORIM, 1972; CARVALHO et al., 1994; CARVALHO & CHALFOUN, 1997).

Estão sendo realizados trabalhos para detectar quais compostos orgânicos produzidos pelos fungos são capazes de alterar a qualidade da bebida do café. Entre estes compostos orgânicos estão os compostos fenólicos, açúcares totais e açúcares redutores e não redutores. A concentração de cada um desses compostos varia de acordo com o tipo da bebida. Por exemplo, a bebida tipo Rio apresenta o maior teor de polifenóis, as bebidas tipo estritamente mole e riada apresentam os maiores teores de açúcares totais e não redutores e a bebida estritamente mole ainda apresenta o maior teor de açúcares redutores (PINTO, et al, 2001).

O composto 2,4,6 – tricloroanisol (TCA) é uma das principais causas de contaminação em alimentos fechados não hermeticamente e crus. O TCA provoca um intenso odor de mofado nos alimentos e bebidas (HILL et al., 1995). O TCA, além disso, é considerado o principal agente contribuidor para o aparecimento da bebida tipo Rio (SPADONE et al., 1990).

A maior parte do café brasileiro produzido tem apresentado “gosto rio ou riada”, o qual confere sabor desagradável ao produto. Este sabor é descrito como fenólico iodo ou medicinal e confere um forte aroma, o qual pode ser conferido pela presença e ação de microrganismos (DENTAM, 1989).

3.5. Qualidade da bebida

As exportações do café brasileiro vêm declinando nos últimos anos, principalmente devido ao aumento da produção de cafés suaves por outros países da América do Sul e da América Central, de qualidade superior à do café produzido e ofertado pelo Brasil (CARVALHO et al., 1994).

A influência de fatores como a composição química dos grãos, determinada por fatores genéticos, ambientais e culturais, os métodos de colheita, processamento e armazenamento, são importantes por afetarem diretamente a qualidade da bebida do café. A torração e o preparo da bebida modificam a constituição química dos grãos, no entanto, essas alterações são dependentes da composição original dos mesmos (LOPES, 2000).

Os fatores que afetam o crescimento de fungos nos grãos são, principalmente, teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo, condição física (grãos quebrados) e sanitária do grão, nível de inóculo do fungo, conteúdo de oxigênio e armazenamento, insetos e ácaros. A invasão de um lote de grãos por insetos pode iniciar ou agravar o desenvolvimento de fungos, pois através de sua atividade metabólica há um aumento de teor de umidade e temperatura da massa dos grãos (PEZZINI, 2005).

Quando o grão de café encontra-se no estágio cereja, sua polpa apresenta elevada concentração de açúcares, o que a torna atrativa não apenas para microrganismos como também para insetos. Assim, os insetos perfuram a epiderme dos frutos para se alimentarem e para procriarem. Após a perfuração da epiderme pelos insetos, a entrada de

microrganismos fica facilitada, permitindo o início da fermentação dos grãos antes da colheita dos frutos, deteriorando a qualidade da bebida (CAMARGO, 1947).

A cafeicultura é uma das principais atividades agrícolas do Brasil, e para a sua sobrevivência, acredita-se que o País precisa seguir o caminho da qualidade. A bebida do café é fator importante na comercialização do produto e a sua caracterização é feita por degustadores (prova de xícara). O café brasileiro é classificado em tipo e bebida. O tipo se refere aos defeitos existentes no café, como grãos deteriorados, pretos, ardidos, verdes, quebrados, conchas, chochos, cocos marinheiros, cascas, torrões, pedras, etc (PIMENTA, 2003).

A “prova da xícara” é uma prova subjetiva em que provadores treinados distinguem diferentes padrões de bebida. Esta é realizada com o café preparado para ser degustado, sendo avaliado quanto ao seu sabor e aroma. Tecnicamente, a classificação oficial do café pela bebida, denominados padrões de bebida, recebem as seguintes denominações: Estritamente Mole, bebida de sabor suavíssimo e adocicado; Mole, bebida de sabor suave, acentuado e adocicado; Apenas Mole, bebida de sabor suave com leve adstringência; Dura, bebida com sabor adstringente e gosto áspero; Riada, bebida com leve sabor de iodofórmio ou ácido fênico; Rio, bebida com sabor forte e desagradável lembrando iodofórmio ou ácido fênico; Rio Zona, bebida de sabor e odor intoleráveis ao paladar e ao olfato. São denominações técnicas que mostram a variedade de sabor e qualidade e que interferem também na cotação do seu preço no mercado (CARVALHO, 1999).

A microbiota associada aos grãos de café é bastante diversificada e está diretamente relacionada a alguns sabores e aromas característicos da bebida. Nas bebidas tipo rio e riada, a infecção por *Aspergillus* é elevada, o que pode estar relacionado com a taxa de umidade superior a 10% encontrada nestes grãos beneficiados. Nos cafés de bebida mole a infecção pelo gênero *Aspergillus* é menor (PIMENTA e CHALFOUN, 2001).

3.6. Micotoxinas

Os fungos são indesejáveis nos alimentos porque são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas que, agindo sobre os alimentos, provocam a sua deterioração. Além disso, muitos fungos podem produzir metabólitos tóxicos quando estão se multiplicando nos alimentos. Estes metabólitos recebem a denominação genérica de

“micotoxinas”, e correspondem a produtos metabólicos secundários que, quando ingeridos com os alimentos, causam alterações biológicas prejudiciais tanto no homem quanto nos animais (micotoxicoses) (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

A produção de micotoxinas está ligada ao crescimento do fungo uma vez que sem o crescimento, geralmente a produção não ocorre. Entretanto, a presença do fungo produtor não indica a presença da micotoxina, especialmente se o crescimento não ocorrer. Portanto, o entendimento dos fatores que permitem o crescimento do fungo e a produção de micotoxinas é de grande importância para o desenvolvimento de métodos de controle (BULLERMAN et al., 1984).

As ocratoxinas são substâncias tóxicas produzidas por várias espécies de fungos (*Aspergillus ochraceus* e *Penicillium* sp.), compreendendo uma família de sete compostos, com apenas a ocratoxina A, contaminante de alimentos, recebendo maior atenção (SOARES, 2000). Essa atenção se estende ao café, já que existe uma ameaça mais imediata de barreira ao comércio do produto, em função da imposição de limites quanto aos níveis de ocorrência desta micotoxina (PIMENTA, 2003). Em alguns países europeus o nível máximo de ocratoxina A foi delimitado em 5 ng/g em cereais e 1ng/g em alimentos destinados a crianças. No Brasil ainda não foram adotadas medidas semelhantes (PRADO et al., 2000).

Estudos têm demonstrado que a ocratoxina A tem ação nefrotóxica, teratogênica, carcinogênica, imuno-supressora e está relacionada com a nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins que afeta exclusivamente população adulta rural. Mais recentemente foram descritos evidências de uma possível correlação entre ocratoxina A e desenvolvimento de tumores do trato urinário de indivíduos da espécie humana (PRADO et al., 2000).

A contaminação de alimentos por micotoxinas pode ocorrer no campo, na colheita, no transporte, no armazenamento e /ou na manufatura dos produtos (SMITH e HENDERSON, 1991). Alguns fatores que influenciam a produção de micotoxinas são: composição do substrato, temperatura, teor de água, umidade relativa do ar, atividade de água, pH, atmosfera, competição microbiana, danos causados por insetos, linhagem do fungo contaminante e estresse da planta (BULLERMAN et al., 1984; COULOMBE, 1991; FRISVAD e SAMSON, 1992; SCUSSEL, 1998; WATSON, 1987), sendo que a

temperatura, umidade e tipo de substrato são os mais importantes (MALLOZZI e CORRÊA, 1998).

3.7. Doenças do cafeeiro

As doenças podem influenciar fortemente a produção cafeeira, sendo que várias podem acometer esta cultura, desde o viveiro até o armazenamento. Além disso, dependendo da região produtora, as doenças são o principal motivo para a baixa produtividade. Essas doenças afetam a produção cafeeira não apenas quantitativamente, mas também qualitativamente. Elas estão relacionadas ao tipo de cultura, ao patógeno, à localidade, ao ambiente e às medidas de controle. Com isso, é importante que os cafeicultores utilizem a diagnose correta para buscarem o melhor tratamento para suas lavouras (GARCIA JÚNIOR et al., 2003).

As principais doenças do cafeeiro são: ferrugem, cercosporiose ou mancha de olho pardo; mancha aureolada e phoma. A ferrugem é provocada pelo fungo *Hemileia vastatrix* (Berk et Br). Ela ataca as folhas do cafeeiro, produzindo manchas amarelas e alaranjadas que, com o desenvolvimento da doença, assumem um aspecto pulverulento na face inferior e clorose na face superior. A disseminação dos uredosporos na lavoura ocorre principalmente pelos respingos das gotas durante as chuvas, por insetos, animais e, em longas distâncias, pelo homem e pelo vento. A ferrugem provoca uma redução de 20 a 30% na produção de café por hectare (ALMEIDA, 1984).

Até janeiro de 1970, quando foi constatada a ferrugem do cafeeiro no Brasil, não havia doenças causando danos econômicos graças às condições climáticas favoráveis e ao sistema de plantio a pleno sol (IBC/GERCA, 1981).

No mundo, a ferrugem alaranjada é a principal doença em abrangência e danos. Já existem vários cultivares brasileiros resistentes, como IAPAR 59, TUPI IAC 1669-33, Obatã IAC 1669-20, OEIRAS MG6851, Paraíso, Catucaí e outras. Os mecanismos e fatores de resistência são bem estudados, porém, é recomendável um contínuo trabalho de melhoramento de cultivares resistentes a *H. vastatrix*, com maior número de genes qualitativos e quantitativos (VARZEA et al., 2002).

A cercosporiose ou mancha de olho pardo é provocada pelo fungo *Cercospora coffeicola* (Berk et Cooke) e ataca principalmente plantas com deficiência nutricional de

nitrogênio. As lesões provocadas são extremamente características, sendo circulares nas folhas, de cor pardo-clara, com um pequeno círculo branco-acinzentado no centro. Este pequeno círculo possui pontuações escuras correspondentes aos corpos de frutificação do fungo. A lesão é envolvida por um pequeno círculo amarelo. A cercosporiose provoca também lesões deprimidas e marrom-claro nos frutos, além de ocasionar a queda prematura dos mesmos (ALMEIDA, 1984).

A mancha aureolada é provocada pela bactéria *Pseudomonas garçae*. Suas manchas são pardo-escuras, de área irregular e envolvidas por um anel amarelado. A área necrosada no centro da lesão geralmente se rompe, ficando um furo em seu lugar. Nas folhas novas, a lesão não apresenta o anel amarelado. O desenvolvimento da bactéria é favorecido por fatores como ventos frios e umidade elevada (ALMEIDA, 1984).

O phoma é provocado pelo fungo *Phoma* spp. Nas folhas, as lesões assumem coloração marrom e formam anéis concêntricos. Nos ramos, são deprimidas e de cor marrom. E nos frutos, circulares, deprimidas e com pontuações negras correspondentes às frutificações do fungo. O desenvolvimento do fungo é favorecido por temperaturas baixas, excesso de umidade e vento (ALMEIDA, 1984).

3.8. Pragas do cafeeiro

As pragas do cafeeiro variam com as diferentes regiões cafeeiras do país, sendo que o bicho mineiro, a broca e as conchonilhas são as pragas que mais afetam os cafezais brasileiros. O controle dessas pragas é realizado basicamente com produtos químicos, sendo o controle biológico pouco utilizado (IBC/GERCA, 1981).

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), é uma importante praga da cultura do café nas principais regiões produtoras da cultura no Brasil (SOUZA e REIS, 1997) e no mundo (BARRERA et al., 1990; BAKER, 1999). É natural da África equatorial, região de Uganda, de onde se espalhou para outras partes do globo (SOUZA e REIS, 1997), alcançando o Brasil provavelmente em 1913, a partir de sementes infestadas trazidas do Congo Belga para o interior de São Paulo (BENASSI, 1995; SOUZA e REIS 1997; CANTOR et al., 2000). Atualmente, a broca se encontra praticamente em todos os países produtores de café (BUSTILLO et al., 2002) e tem causado grandes perdas em vários países da África e nos países em que foi introduzida (LE PELLEY, 1968). O inseto coloniza os

frutos de café, em todos os estádios de maturação (GUHARAY e MONTERREY, 1997), afetando a produtividade e modificando a qualidade do café pela entrada de microrganismos, que se desenvolvem nos grãos (BENASSI, 1989).

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* é o principal fator de mortalidade da broca-do-café nos países africanos e nos países do continente americano (AESCHBACH, 2004). BUSTILLO et al. (2002) desenvolveram uma pesquisa para encontrar inimigos naturais da broca-do-café na região colombiana. Foram encontrados 5 espécies de fungos e 2 gêneros de bactérias infectando a broca-do-café, sendo eles: *B. bassiana*, *Hirsutella eleutheratorum*, *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces lilacinus* e os gêneros de bactérias *Bacillus* sp. e *Serratia* sp.. A espécie que provoca maior mortalidade da broca-do-café é *B. bassiana*.

Segundo AESCHBACH (2004), a broca-do-café é a única espécie que consegue utilizar os grãos de café como recurso alimentar. A cafeína apresenta toxicidade para os insetos, entretanto, este inseto possui um mecanismo de detoxificação (processo metabólico onde substâncias tóxicas são reduzidas pelo organismo) que é ausente na maioria das espécies que não sobrevivem nos grãos de café.

O bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville), causa sérios prejuízos econômicos na maioria das regiões produtoras de café (SOUZA et al., 1998). Os danos causados por essa praga são devidos à formação de galerias no interior das folhas, decorrentes da alimentação das larvas com o tecido parenquimático, causando necrose e diminuição da área fotossintética, acarretando queda das folhas e redução da produção de frutos (FRAGOSO, 2003). O controle químico tem sido o principal método empregado pelos cafeicultores para o controle desta praga (SOUZA et al., 1998).

A cochonilhas encontram-se em quase todas as regiões cafeeiras do país e os ataques ocorrem somente em condições climáticas favoráveis. Os danos causados manifestam-se pela sucção contínua da seiva (IBC/GERCA, 1981).

3.9. Café armazenado

Segundo CHRISTENSEN et al. (1969), conhecer os fungos e entender como, onde e porque eles crescem é necessário para aqueles que lidam com grãos e sementes armazenados, pois um dos principais requisitos para um bom armazenamento é a prevenção

de crescimento dos fungos. Os fungos de campo, que invadem as sementes antes da colheita, diferem quanto à predominância de acordo com a cultura, região ou localização geográfica e clima. Os fungos de armazenamento compreendem cerca de uma dúzia de espécies de *Aspergillus* e várias espécies de *Penicillium*.

Trabalhando com grãos de cafés submetidos a diferentes tempos de espera antes da secagem, PIMENTA e VILELA (2003) detectaram que, com o aumento na espera antes da secagem, os gêneros *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. diminuíram e as espécies *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus niger* variaram de forma indefinida, com altas taxas de infecção em todos os tempos avaliados.

Uma maneira de se controlar o surgimento de fungos em cafés armazenados é reduzir o teor de umidade dos grãos de café abaixo de 15% (PRADO et al., 2000).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material biológico

Os grãos analisados foram coletados na Estação Experimental do Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), localizada na cidade de Londrina, no estado do Paraná. Os grãos de café da variedade IAPAR 59 analisadas pertencem à safra de 2004/2005 e apresentam resistência à ferrugem.

Dividiu-se a plantação em parcelas com 50 cafeeiros cada. O experimento iniciou-se com a retirada dos frutos dos cafeeiros e do chão. A cada 30 dias foram coletados, destas parcelas, frutos da árvore e frutos que caíram no chão, totalizando 5 tempos de colheita. A colheita foi feita pelo método da derriça no chão, seguida de secagem e armazenamento dos grãos, realizada pelos técnicos da Estação Experimental do IAPAR.

Foram coletadas 4 amostras em 5 tempos, sendo eles 0, 30, 60, 90 e 120 dias. Totalizou-se 40 amostras, sendo 20 amostras com grãos originados do solo e 20 amostras com grãos originados da árvore.

As amostras foram recebidas após a secagem e beneficiamento dos grãos, e então foi realizada a prova da xícara com classificadores especializados, e testes de detecção da presença de Ocratoxina A. Os resultados dos testes foram fornecidos pelo IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná).

4.2. Meio de cultura e soluções

4.2.1. Meio Batata Dextrose Ágar (Biobrás Diagnósticos – Montes Claros/MG)

BDA.....	39,0g
Água destilada.....	1000mL

O meio foi preparado conforme indicação do fabricante, sendo então esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Utilizou-se a concentração de 40µg/mL de tetraciclina.

4.2.2 Água peptonada

Cloreto de sódio.....	5,0g
Peptona.....	15,0g
Água destilada.....	1000mL

Todos os compostos foram misturados, sendo esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

4.2.3. Lactofenol de Amann (CRUZ, 1981)

Ácido láctico.....	10,0g
Ácido fênico.....	10,0g
Glicerina.....	20,0g
Água destilada.....	10,0mL

4.3. Isolamento dos fungos

Para a determinação da população fúngica utilizou-se a técnica “Pour-plate” (APHA, 2005), modificada por BOZZA e PIMENTEL (2006).

4.3.1 Técnica “Pour-plate”

Em um Erlenmeyer, contendo 90 mL de água peptonada, colocou-se 10 g de café moído, o qual permaneceu no agitador por 30 minutos a 36°C. A inoculação foi feita em fluxo laminar, sendo 3 diluições (10^1 , 10^2 e 10^3), com 4 placas cada diluição. Foi colocado 1 mL (1000 µL) na placa e, posteriormente, verteu-se o meio BDA fundido, em temperatura média, e homogeneizou-se. Para preparar as demais diluições utilizou-se tubos de ensaios contendo 9 mL de água peptonada (item 4.2.2.). Para o isolamento dos fungos dos grãos foi utilizado o meio de cultura Agar BDA (Batata Dextrose Ágar - Biobrás

Diagnósticos – Montes Claros/MG) (item 4.2.1.), juntamente com tetraciclina (160 µL para 400 mL de meio de cultura). As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 4 dias.

Após o período de incubação realizou-se a contagem das colônias. O isolamento dos fungos foi realizado repicando as colônias em tubos de ensaio, com o meio de cultura BDA inclinado (item 4.2.1.), incubados em estufa com temperatura média de 28°C de 3 a 5 dias. Os isolados foram, então, agrupados de acordo com sua morfologia colonial.

4.4. Identificação dos isolados

Realizou-se a técnica do microcultivo (KERN e BLEWINS, 1999) em um isolado de cada grupo morfológico. Utilizou-se lâminas de microcultivo com 7 e 14 dias de crescimento. A identificação foi realizada através de observações de corpos de frutificação ao microscópio óptico e da utilização de literatura especializada. (KLICH e PITT, 1988) (BARNETT e HUNTER, 1987) (LARONE, 1987) (HAZEN et al., 1973) (MENEZES e OLIVEIRA, 1993) (KERN, 1988) (HERRERA e ULLOA, 1990). Como método auxiliar na identificação foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.4.1 Técnica do microcultivo (KERN e BLEWINS, 1999)

Foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Um cubo de aproximadamente 1 cm³ de meio de cultura BDA foi cortado e colocado sobre uma lâmina contida no interior da placa. Repicou-se o isolado em todos os lados do cubo, o qual foi posteriormente coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior foi umedecido com água destilada esterilizada e a placa foi incubada em estufa por 7 a 14 dias, a aproximadamente 28°C. Após o tempo determinado, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de Lactofenol de Amann (item 4.2.3.), sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico.

4.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Lâminas retiradas do microcultivo com 14 dias de crescimento foram fragmentadas com o auxílio de uma pinça. A fixação do material foi feita com Glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 2 horas em temperatura ambiente (1:1). A lavagem, em tampão cacodilato 0,1 M, 3 vezes, 10 minutos cada. O material foi submetido à pós-fixação com Tetróxido de Ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, de 30 a 60 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Foi realizada em seguida a lavagem em tampão cacodilato 0,1 M, 3 vezes de 10 minutos, a desidratação em álcool 50%, 70%, 90% e 100% (o último 2X), 10 a 20 minutos cada. O ponto crítico foi obtido por meio de CPD-030 Critical Point Dryer e a metalização em ouro em Balzers Union FL 9496 Balzers (Modelo: SCD030). A observação foi feita ao microscópio eletrônico JSM – 6360LV Scanning Electron Microscope (300 mil X).

4.5. Análise estatística

Os dados relativos ao número de colônias isoladas foram transformados para $\log(x+2)$ com o intuito de estabelecer a normalidade dos dados. Realizou-se a Análise de Variância (ANOVA) segundo o delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com esquema fatorial 2X5 com 16 repetições. Um dos fatores foi o local com dois níveis (solo e árvore) e o outro, o tempo de colheita com cinco níveis (0, 30, 60, 90 e 120 dias após a primeira colheita).

Quando foi encontrado significância para o teste F, complementou-se a ANOVA com o teste de Tukey para médias (PIMENTEL, 1990).

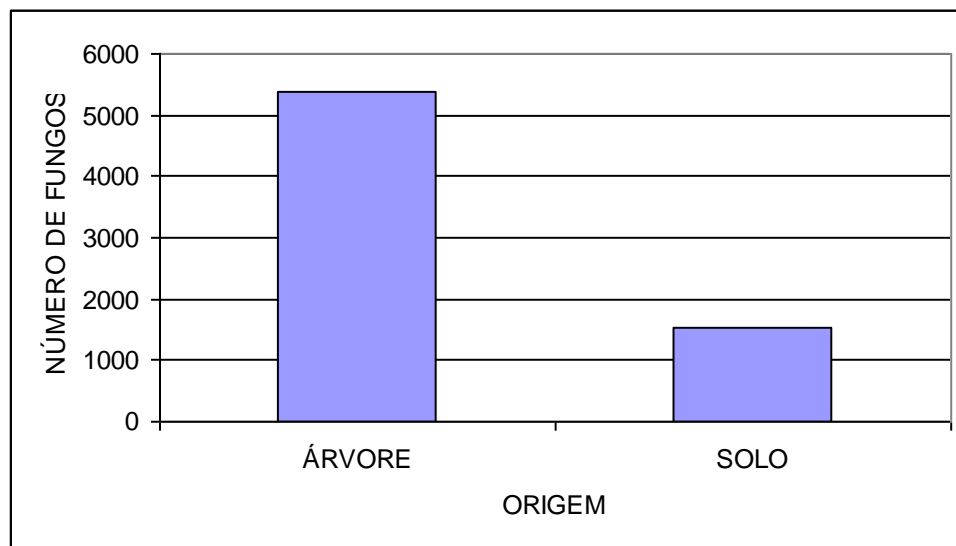
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento dos fungos de grãos de café da variedade IAPAR 59 e as diferença entre solo e árvore.

Foram obtidos 6916 isolados fúngicos dos grãos de café de duas origens (solo e árvore), em 5 diferentes tempos de colheitas. Estes isolados foram classificados em 7 gêneros: *Acremonium*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces* e *Penicillium* (FIGURAS 18 a 38 – ANEXOS). Estes resultados diferem daqueles encontrados por PIMENTA e CHALFOUN (2001), que observaram uma maior ocorrência dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium* em isolados do grão coco. Isto pode ter ocorrido devido a uma diferença de metodologia, já que estes autores utilizaram o método *blotter*, que consiste na incubação dos frutos em placas de Petri, contendo duas folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada, com temperatura de 23°C e fotoperíodo de 12 horas de luminosidade controlados.

Como pode ser observado no gráfico 1, tabela 1 e na tabela 3 (ANEXOS), houve diferença significativa no número absoluto de fungos encontrados na árvore (5393 isolados) e no solo (1523 isolados) em café de diferentes origens. Estes resultados não estão de acordo com os dados de AESCHBACH et al. (2004), os quais, isolando fungos de grãos de café da variedade Iapar 59, associados à qualidade da bebida, constatou que dentre os 14 fungos isolados, 10 foram isolados de grãos coletados do solo. Estes resultados são, possivelmente, devidos à maior exposição desses grãos aos fatores climáticos, como chuva, umidade e orvalho, propiciando maior possibilidade de infecção dos grãos coletados do solo, pelos fungos. O grande número de fungos isolados dos grãos de café, provenientes da árvore (safra de 2004/2005), pode estar relacionado às condições climáticas que ocorreram durante o experimento, como mudança na umidade relativa do ar. A alta umidade relativa do ar e alta temperatura podem propiciar a infecção e crescimento de microrganismos (PIMENTA et al., 2003).

GRÁFICO 1 – NÚMERO ABSOLUTO DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE E DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005)



Fonte: O autor

Os gêneros encontrados em maior número absoluto foram: *Aspergillus* sp1 (2852 isolados), *Aspergillus* sp3 (490 isolados), *Aspergillus* sp7 (461 isolados), *Aspergillus* sp10 (1552 isolados) e *Aspergillus* sp12 (605 isolados). Os gêneros encontrados em menor número absoluto foram: *Paecilomyces* sp. (15 isolados), *Penicillium* sp3 (15 isolados), *Aspergillus* sp5 (4 isolados), *Aspergillus* sp8 (15 isolados) e *Absidia* sp. (4 isolados) (TABELA 1).

TABELA 1 — NÚMERO ABSOLUTO DE GÊNEROS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE E DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005)

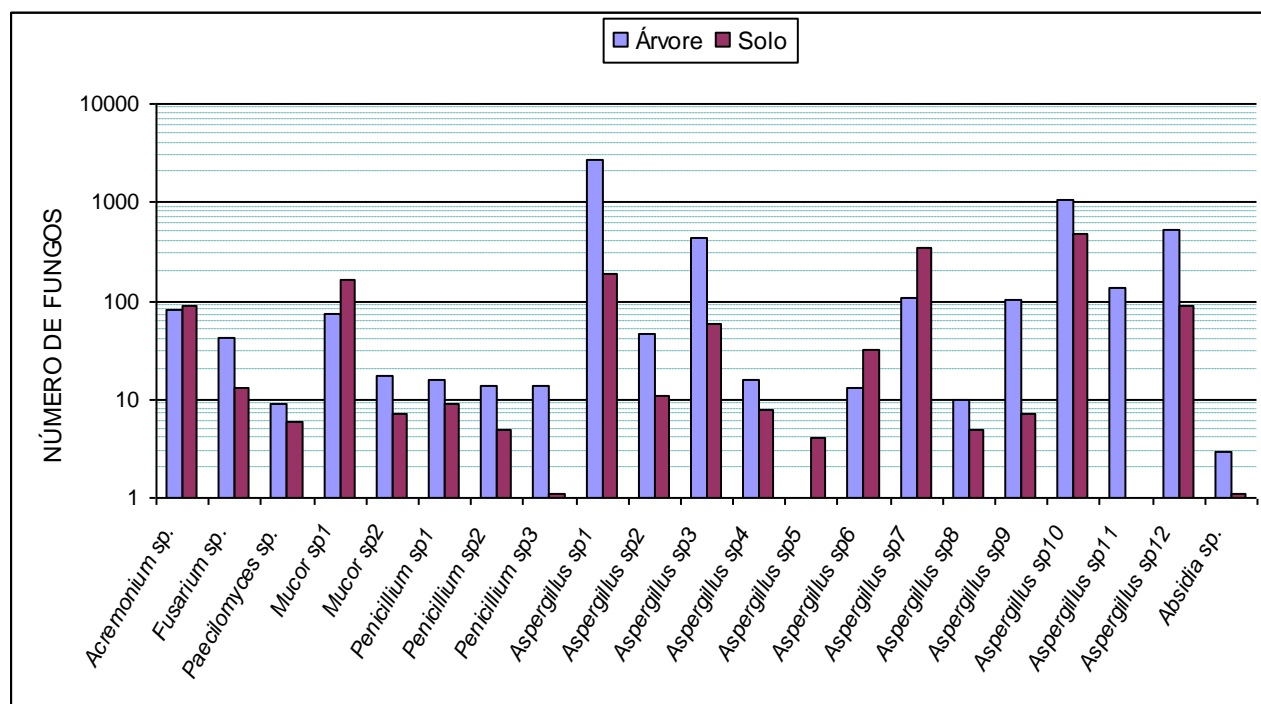
Gêneros	Número de isolados da Árvore	Número de isolados do Solo	Número total de isolados
<i>Acremonium</i> sp.	82	87	169
<i>Fusarium</i> sp.	43	13	56
<i>Paecilomyces</i>			
sp.	9	6	15
<i>Mucor</i> sp1	74	160	234
<i>Mucor</i> sp2	17	7	24
<i>Penicillium</i> sp1	16	9	25
<i>Penicillium</i> sp2	14	5	19
<i>Penicillium</i> sp3	14	1	15
<i>Aspergillus</i> sp1	2665	187	2852
<i>Aspergillus</i> sp2	47	11	58
<i>Aspergillus</i> sp3	431	59	490
<i>Aspergillus</i> sp4	16	8	24
<i>Aspergillus</i> sp5	0	4	4
<i>Aspergillus</i> sp6	13	32	45
<i>Aspergillus</i> sp7	109	352	461
<i>Aspergillus</i> sp8	10	5	15
<i>Aspergillus</i> sp9	104	7	111
<i>Aspergillus</i> sp10	1071	481	1552
<i>Aspergillus</i> sp11	138	0	138
<i>Aspergillus</i> sp12	517	88	605
<i>Absidia</i> sp.	3	1	4
TOTAL	5393	1523	6916

Fonte: O autor

Com relação aos gêneros isolados da árvore, foram encontrados em maior número: *Aspergillus* sp1 (2665 isolados), *Aspergillus* sp3 (431 isolados), *Aspergillus* sp10 (1071 isolados), *Aspergillus* sp12 (517 isolados), e em menor número: *Paecilomyces* sp. (9 isolados), *Aspergillus* sp5 (0 isolados), *Aspergillus* sp8 (10 isolados) e *Absidia* sp. (3 isolados).

Os gêneros encontrados no solo foram, em maior número: *Aspergillus* sp7 (352 isolados), *Aspergillus* sp10 (481 isolados), e em menor número: *Penicillium* sp3 (1 isolado), *Aspergillus* sp11 (0 isolados) e *Absidia* sp. (1 isolado) (GRÁFICO 2)

GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE E DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005)*



*O gráfico se apresenta em escala logarítmica para que a ampla distribuição numérica seja mais facilmente visualizada.

Fonte: O autor

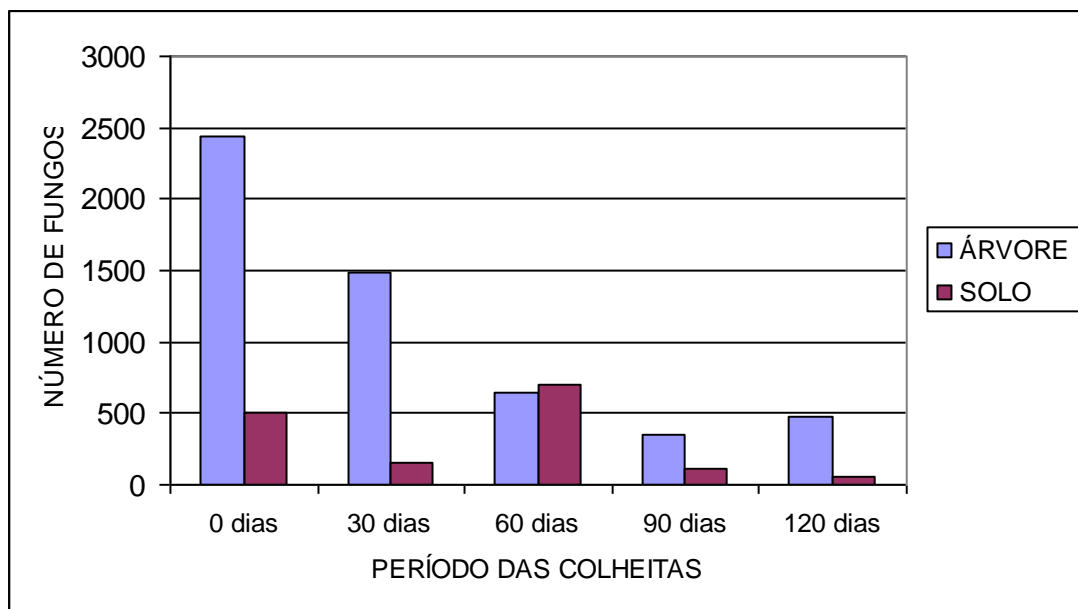
5.2. Isolamento dos fungos de grãos de café da variedade IAPAR 59 e a diferença entre os tempos de colheita.

Foi constatada diferença significativa relacionada ao número total de isolados encontrados nos grãos colhidos, provenientes do solo e da árvore, nos 5 diferentes tempos de colheita, como pode ser observado na tabela 10 (ANEXOS).

O gráfico 3 demonstra que o número absoluto de fungos isolados dos grãos de café originados da árvore sofre, em geral, um decréscimo com o decorrer dos tempos de colheita. Entretanto, no tempo de 120 dias houve um leve aumento em relação ao tempo de 90 dias, fato que pode ter ocorrido, como já citado anteriormente, por uma mudança na umidade relativa do ar (PIMENTA et al., 2003). Neste caso específico, além do aumento do

número absoluto de fungos da árvore, também houve um aumento na diversidade dos isolados, os quais apresentaram mais morfotipos.

GRÁFICO 3 – NÚMERO ABSOLUTO DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE E DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005) EM RELAÇÃO AOS TEMPOS DE COLHEITA.

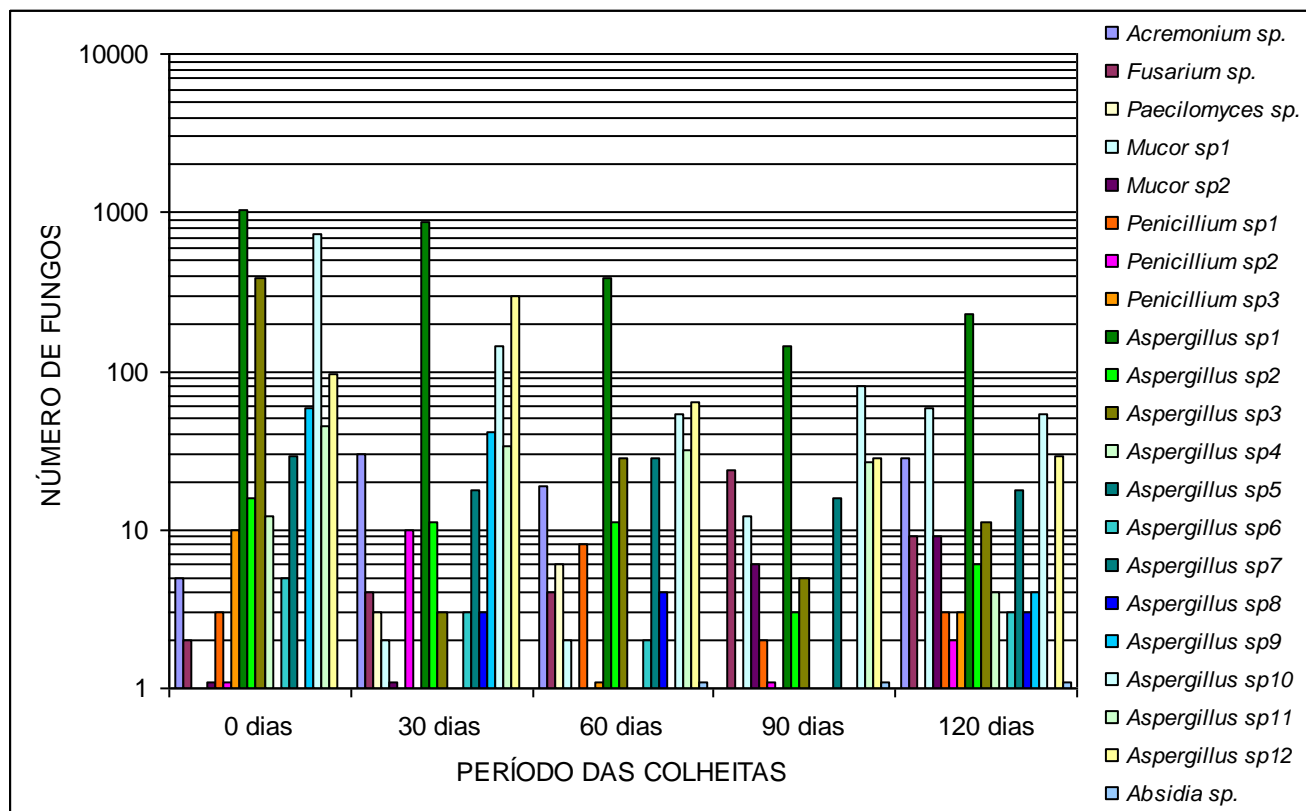


Fonte: O autor

O tempo com o maior número de morfotipos, isolados da árvore, foi o de 120 dias, com 18 morfotipos diferentes. Em seguida 0, 30 e 60 dias, com 16 morfotipos; e 90 dias com 13 morfotipos (GRÁFICO 4).

O decréscimo do número absoluto de fungos no decorrer dos tempos de colheita também foi observado nos fungos isolados de grãos provenientes do solo. Porém, observou-se que no tempo de 60 dias houve um aumento no número absoluto de fungos (GRÁFICO 3). Neste caso, o período da colheita foi permeado por chuvas e elevadas temperaturas, o que pode ter favorecido a infecção dos grãos por fungos. Segundo PAULA et al. (1984), o processo de estabelecimento e crescimento dos microrganismos pode ser facilitado por fatores ambientais, como elevada umidade e temperatura. Essas condições aceleram o processo de senescência dos frutos e o processo de estabelecimento de microrganismos. O tempo de 90 dias além de apresentar o menor número absoluto de fungos, também apresentou a menor diversidade em relação aos demais tempos de colheita.

GRÁFICO 4 – NÚMERO ABSOLUTO DOS MORFOTIPOS DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005) EM RELAÇÃO AOS TEMPOS DE COLHEITA*

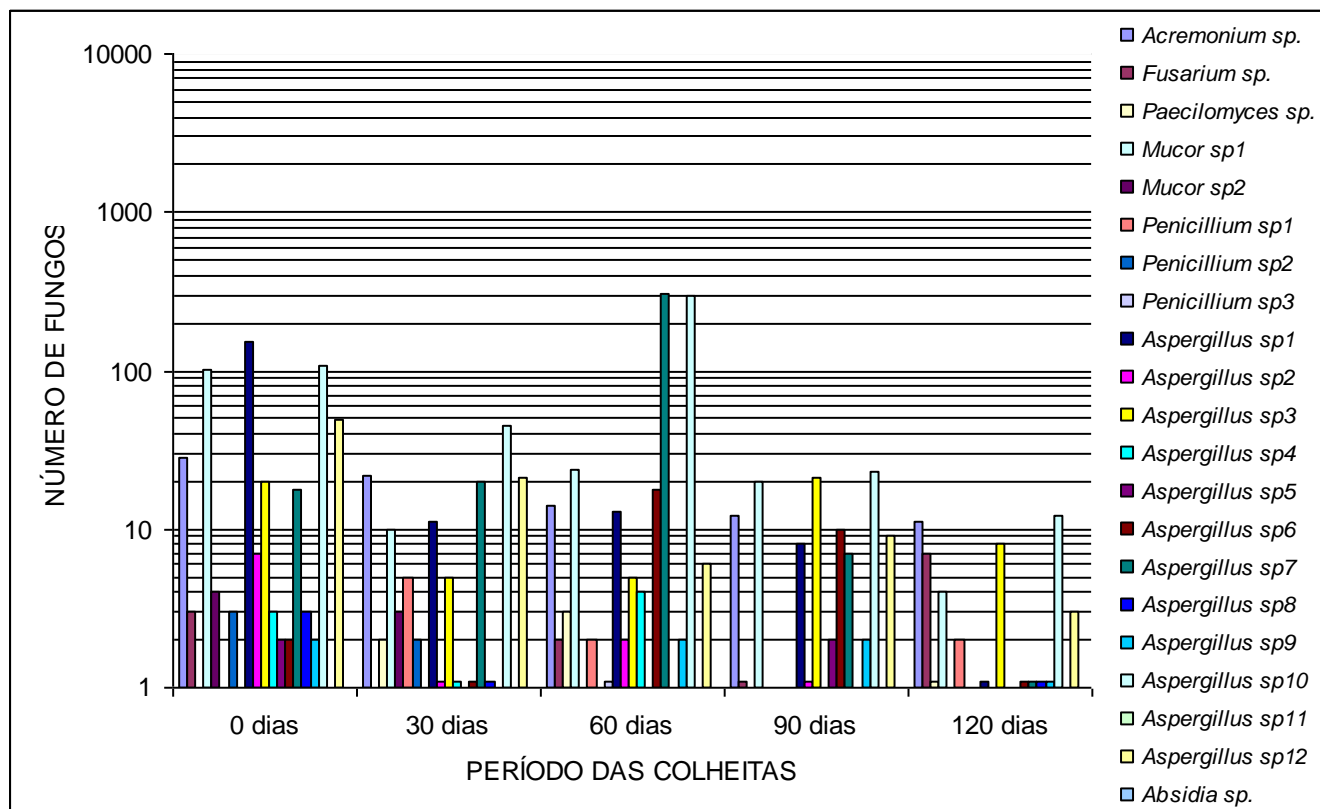


*O gráfico se apresenta em escala logarítmica para que a ampla distribuição numérica seja mais facilmente visualizada.

Fonte: O autor

O tempo de colheita com maior número de morfotipos, originados do solo, foi de 0 dias, com 17 morfotipos, seguido dos tempos 30 e 60 dias com 14 morfotipos, 120 dias com 13 morfotipos, e o tempo com menor número de espécies foi o de 90 dias, com 12 morfotipos (GRÁFICO 5).

GRÁFICO 5 - NÚMERO ABSOLUTO DOS MORFOTIPOS FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA CV. IAPAR 59 DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005) EM RELAÇÃO AOS TEMPOS DE COLHEITA*



* O gráfico se apresenta em escala logarítmica para que a ampla distribuição numérica seja mais facilmente visualizada.

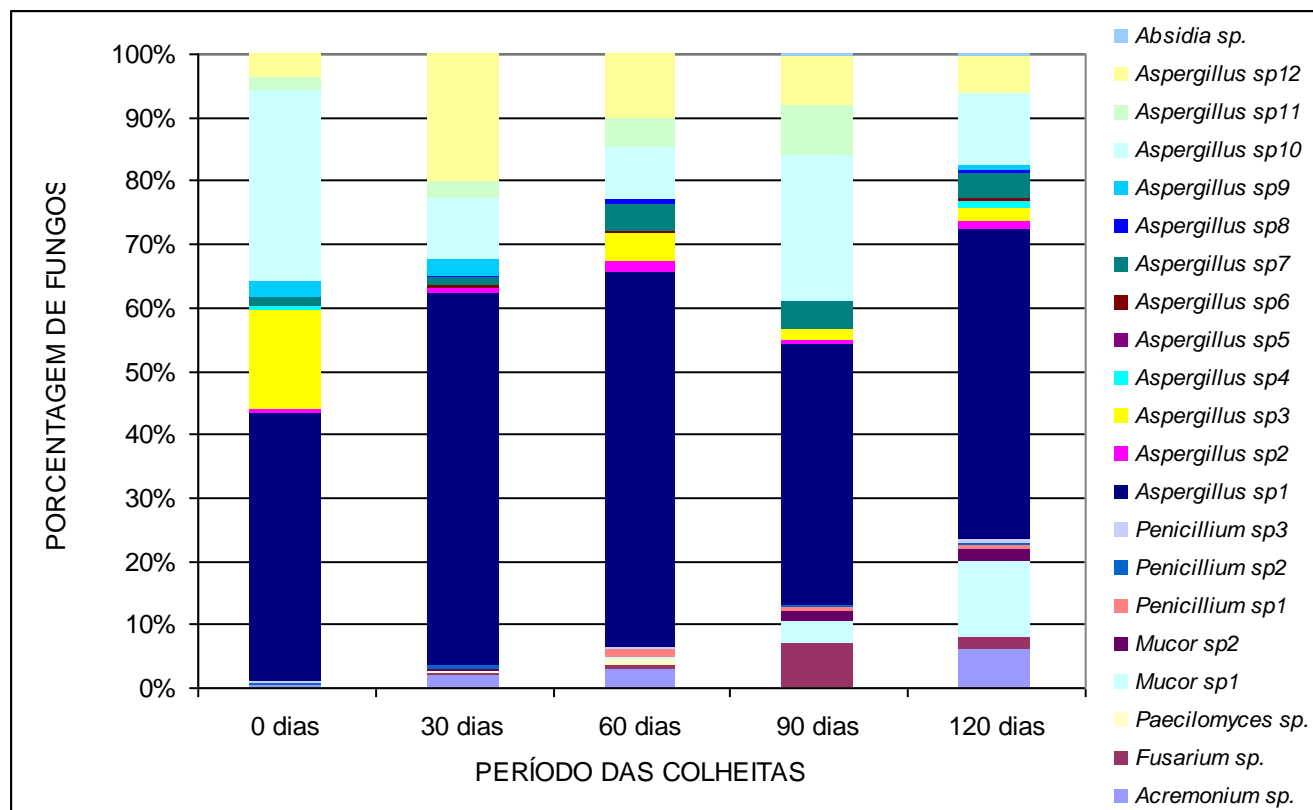
Fonte: O autor

Houve um decréscimo do número de fungos a partir dos 60 dias de colheita até 120 dias, tanto de grãos colhidos da árvore como também daqueles colhidos do solo. Deve-se ressaltar que, os grãos do solo sofrem uma maior exposição às condições do ambiente, aumentando a velocidade da decomposição dos mesmos, assim, com a perda de seu substrato os fungos decrescem em número. Já os grãos originados da árvore sofrem uma menor influência das condições ambientais, porém verificou-se que houve também uma queda no número dos mesmos.

Os resultados obtidos para os fungos isolados nos diferentes tempos de colheitas podem ser observados nos gráficos 6 e 7 e tabelas de 3 a 17 (ANEXOS). O gráfico 6

apresenta os dados relativos à porcentagem de morfotipos de fungos da árvore ao decorrer dos diferentes tempos de colheita

GRÁFICO 6 – PORCENTAGEM DOS MORFOTIPOS DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005)



Fonte: O autor

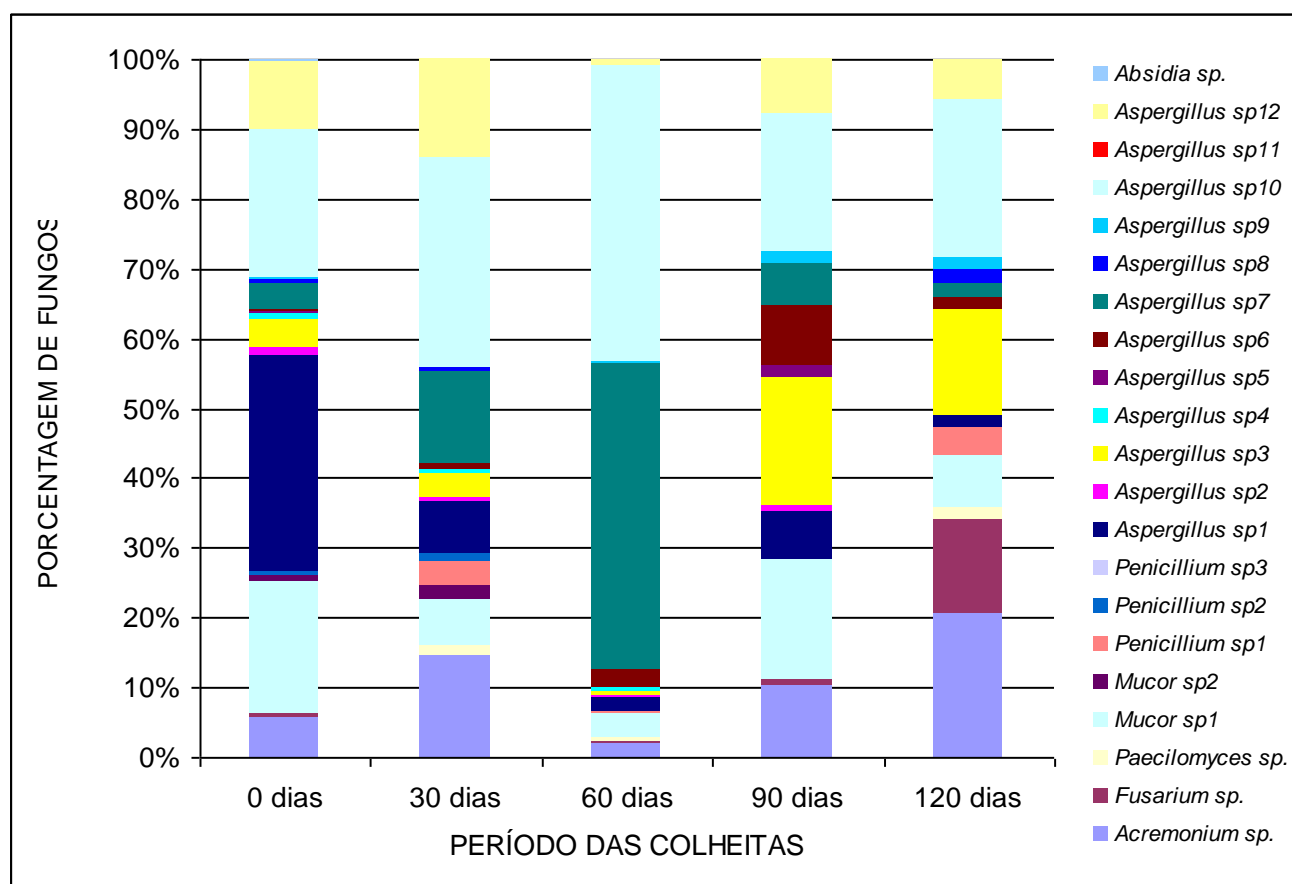
Em todos os tempos de colheita a maior frequência foi de *Aspergillus sp1*, tempo inicial (0 dias) (19,14%), tempo 30 dias (16,17%), tempo 60 dias (7,14%), tempo 90 dias (2,67%) e tempo 120 dias (4,3%).

Em menor frequência no tempo 0 dias observou-se *Mucor sp2* e *Penicillium sp2* (0,02%). No tempo 30 a menor frequência foi *Mucor sp2* (0,02%), já no tempo 60 a menor frequência encontrada foi *Penicillium sp3* e *Absidia sp.* (0,02%). No tempo 90, *Absidia sp.* (0,02%), e no tempo 120, *Penicillium sp2* (0,04%).

Observou-se que o morfotipo que prevaleceu em todos os tempos de colheita, de grãos originados da árvore, foi *Aspergillus* sp 1, em que a maior frequência foi relatada no tempo inicial (0 dias), diminuindo com o passar dos tempos de colheitas.

Os dados relativos à porcentagem dos morfotipos de fungos do solo ao decorrer dos diferentes tempos de colheita são apresentados no gráfico 7.

GRÁFICO 7 – PORCENTAGEM DOS MORFOTIPOS DE FUNGOS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005)



Fonte: O autor

No solo, no tempo 0, a maior frequência foi do *Aspergillus* sp1 (1,11%), enquanto que a menor foi da *Absidia* sp. (0,06%). Em seguida, *Aspergillus* sp5 (0,13%), *Aspergillus* sp6 (0,13%) e *Aspergillus* sp9 (0,13%). No tempo 30, a maior frequência foi *Aspergillus* sp10 (2,96%) e a menor de *Aspergillus* sp2, *Aspergillus* sp4, *Aspergillus* sp6 e *Aspergillus* sp8 (0,06%). No tempo 60, a maior frequência *Aspergillus* sp7 (20,1%), e a menor frequência *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp3 (0,06%). No tempo 90, a maior frequência foi

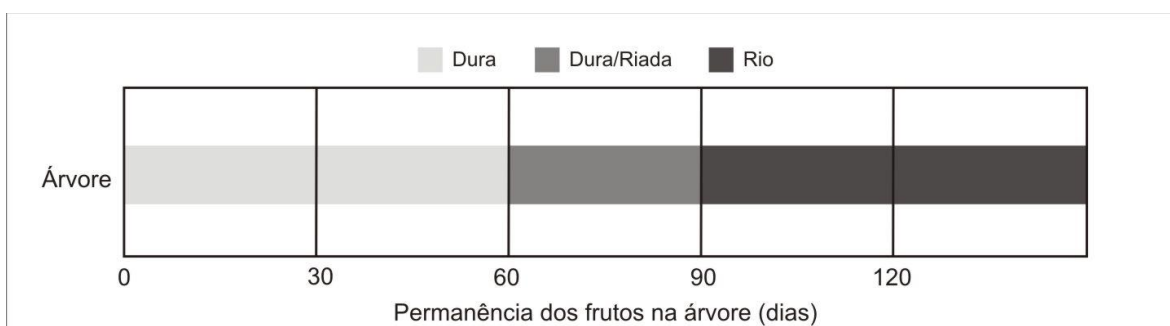
Aspergillus sp10 (1,51%) e a menor *Aspergillus* sp2 (0,06%). No tempo 120, a maior frequência foi *Aspergillus* sp10 (0,79%) e a menor frequência foi de *Paecilomyces* sp., *Aspergillus* sp6, *Aspergillus* sp7, *Aspergillus* sp8 e *Aspergillus* sp9 (0,06%).

Observou-se que em todos os tempos, o gênero *Aspergillus* sp foi mais frequente.

5.3. Fungos isolados de grãos de café da variedade IAPAR 59 e a qualidade da bebida em relação à origem dos grãos e aos tempos de colheita.

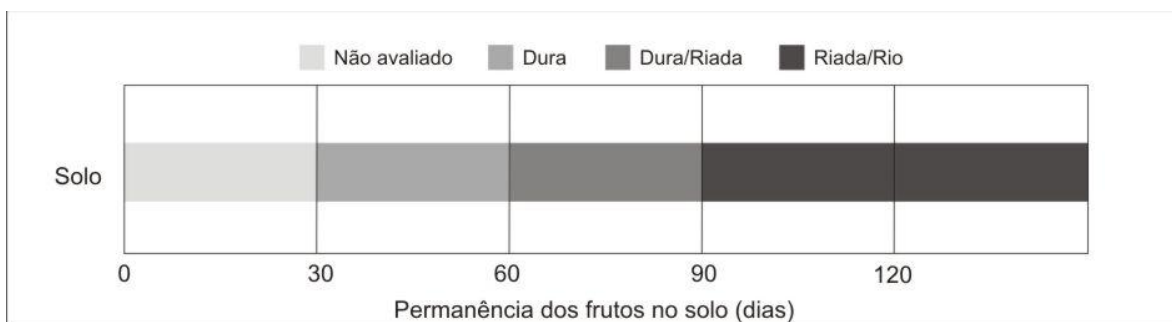
Os dados relativos à qualidade da bebida em relação ao tempo de colheita podem ser observados nos gráficos 8 e 9. A prova da xícara indicou uma alteração na qualidade da bebida de grãos coletados de árvore em relação ao tempo de colheita. De dura, a bebida passou a ser qualificada como Rio. A bebida de grãos coletados do solo também sofreu alteração, de Dura, passou a ser classificada como Riada/Rio.

GRÁFICO 8 – QUALIDADE DA BEBIDA DE CAFÉ DE GRÃOS CV. IAPAR 59 DA ÁRVORE DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005)



Fonte: DECAF-PR; IAPAR; EMATER; CCCNP; BCML

GRÁFICO 9 – QUALIDADE DA BEBIDA DE CAFÉ DE GRÃOS CV. IAPAR 59 DO SOLO DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005).



Fonte: DECAF-PR; IAPAR; EMATER; CCCNP; BCML

TABELA 2 – NÚMERO DE DEFEITOS DOS GRÃOS DE CAFÉ CV. IAPAR 59 DO SOLO E DA ÁRVORE DA REGIÃO DE LONDRINA - PR (SAFRA 2004/2005)

Colheita	Dias	Número de defeitos	
		Árvore	Solo
1ª 27/06	0	12	
2ª 27/07	30	30	75
3ª 27/08	60	18	60
4ª 27/09	90	369	339
5ª 27/10	120	438	462

Fonte: DECAF-PR; IAPAR; EMATER; CCCNP; BCML

A análise do número de defeitos dos grãos de café é de extrema importância para se realizar a prova da xícara. O tipo de café se refere aos defeitos existentes, como grãos deteriorados, pretos, ardidos, verdes, quebrados, conchas, chochos, cocos marinhos, cascas, torrões, pedras, etc. (PIMENTA, 2003). Em relação ao número de defeitos (TABELA 2), observou-se que houve um aumento, tanto nos grãos originados do solo quanto da árvore, ao passar das colheitas. Este aumento no número de defeitos ocorreu,

pois, quanto mais tempo os grãos permanecem no solo ou na árvore, maior a probabilidade de ocorrer doenças e ataques de pragas, além de contaminação por fungos.

Na bebida originada dos grãos coletados da árvore, observou-se que houve uma piora na sua qualidade. CARNEIRO FILHO et al. (2001), relacionando o tempo de permanência dos frutos na árvore com a qualidade de bebida, também obtiveram uma piora da qualidade da bebida. Entretanto, a bebida, de apenas mole passou a dura, com o aumento de permanência dos frutos na árvore. O mesmo resultado foi obtido por AESCHBACH (2004), trabalhando com isolamento de fungos de grãos ao café da variedade Iapar 59 associados à qualidade da bebida.

A baixa qualidade da bebida de café, de grãos originados da árvore, pode estar relacionada com o número elevado de fungos do gênero *Aspergillus* sp. A presença deste gênero, desde o tempo 0, pode indicar uma maior participação deste fungo nos processos fermentativos que alteram a qualidade da bebida de café, em especial o morfotipo *Aspergillus* sp1, que foi encontrado em maior frequência no tempo 0 dias e diminuindo ao passar das colheitas. Portanto, este foi o morfotipo com frequência predominante em todos os tempos de colheita de grãos originados da árvore. Deste modo, a qualidade da bebida no tempo 0 (dura) pode estar relacionada com a alta frequência do gênero *Aspergillus* sp., pois PIMENTA e VILELA (2003) obtiveram, no tempo 0, uma bebida considerada apenas mole, com uma frequência de *Aspergillus* sp. baixa, tendo um aumento nos demais tempos de colheita. Isso difere dos dados obtidos neste trabalho, uma vez que ocorreu uma piora na qualidade da bebida desde o início da colheita (tempo 0).

Na bebida de grãos coletados do solo observou-se também uma piora na qualidade, pois com o passar do tempo os grãos se tornam mais suscetíveis ao ataque de fungos. Além disso, quando a fermentação provocada pelos fungos é prolongada, a infecção torna-se acentuada e inicia-se a produção de compostos responsáveis pelo sabor desagradável (PIMENTA & VILELA, 2003).

O gênero *Aspergillus* sp. foi isolado com a maior frequência em todos os tempos de colheita. Diferente do resultado obtido no isolamento de fungos de grãos originários da árvore, os fungos isolados de grãos originados do solo não apresentaram uma prevalência de apenas um morfotipo (*Aspergillus* sp1) ao decorrer dos tempos de colheita, mas sim do gênero *Aspergillus* sp., com vários morfotipos, demonstrando uma maior diversidade.

Nas bebidas tipo rio e riada, a infecção por *Aspergillus* é elevada, o que pode estar relacionado com a taxa de umidade superior a 10% encontrada nestes grãos beneficiados. Nos cafés de bebida mole, a infecção pelo gênero *Aspergillus* é menor (PIMENTA e CHALFOUN, 2001).

O gênero *Aspergillus* tem sido descrito como um fungo de armazenamento (CHRISTENSEN e KAUFMANN, 1969), e como sua frequência aumenta com o tempo de armazenamento, uma maneira de reduzir sua densidade seria melhorar as condições de armazenamento, por meio de controle de umidade e temperatura mais eficiente.

5.4. Fungos isolados de grãos de café da variedade IAPAR 59 e níveis de Ocratoxina A em relação à origem dos grãos e aos tempos de colheita.

Os dados obtidos dos níveis de Ocratoxina A, em relação à origem dos grãos e os diferentes tempos de colheita, podem ser observados na tabela 13.

TABELA 3 – ANÁLISE DOS NÍVEIS DE OCRATOXINA (OTA) DOCAFÉ DA CV. IAPAR 59 DO SOLO E DA ÁRVORE DA REGIÃO DE LONDRINA – PR (SAFRA 2004/2005)

DATA	DIAS	LOCAL	OTA (ng/g)				
			Amostra I	Amostra II	Amostra III	Amostra IV	Amostra V
1ª 27/06	0	árvore	nd	3,63	nd	nd	nd
		solo	7,75	nd	nd	nd	0,84
2ª 27/07	30	árvore	nd	nd	nd	nd	nd
		solo	nd	nd	nd	nd	21,58
3ª 27/08	60	árvore	nd	nd	nd	nd	nd
		solo	0,85	1,42	nd	nd	nd

4ª 27/09	90	árvore solo	nd 5,13	1,7 1,18	nd 0,25	nd 11,28	nd 0,8
5ª 27/10	120	árvore solo	0,21 nd	nd nd	42,49 nd	0,64 nd	nd nd

Fonte: LACQSA – Equipe da Dra. Eugênia Azevedo Vargas – MAPA-MG

Os níveis de ocratoxina detectados nas amostras de café analisadas, em alguns casos, estão acima dos valores permitidos por países europeus, onde o nível máximo de ocratoxina A foi delimitado em 5 ng/g em cereais e 1ng/g em alimentos destinados a crianças. No Brasil ainda não foram adotadas medidas semelhantes (PRADO et al., 2000), existindo apenas legislação para aflotoxinas.

Esta análise foi de extrema importância para ressaltar que, apesar do morfotipo *Aspergillus* sp1 ter sido encontrado em maior número em grãos da árvore (gráficos 3 e 4), provavelmente não deve ser produtor de ocratoxina, como mostram os dados da tabela 3. Entretanto, em uma única amostra, na 5ª colheita, aos 120 dias, foram detectados altos teores de ocratoxina. Novas análises se fazem necessárias, uma vez que apenas esta amostra apresenta teores muito elevados em relação aos demais resultados.

Deve-se ressaltar que, no solo, os isolados do gênero *Aspergillus* sp1 (gráficos 3 e 5) foram encontrados em menor número em relação aos demais morfotipos do gênero *Aspergillus*, observando-se claramente que houve uma maior diversidade dos morfotipos pertencentes a esse gênero. Possivelmente, alguns destes morfotipos tiveram papel importante como produtores de ocratoxina, como observado na tabela 3.

A ocratoxina A possui ação nefrotóxica, teratogênica, carcinogênica, imuno-supressora e está relacionada com a nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins que afeta exclusivamente população adulta rural. Mais recentemente foram descritas evidências de uma possível correlação entre ocratoxina A e desenvolvimento de tumores do trato urinário de seres humanos (PRADO et al, 2000).

Baixos níveis de Ocratoxina foram detectados por outros autores. PRADO et al (2000), estudando a incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumidos na cidade de Belo Horizonte, MG, detectaram níveis de ocratoxina A não expressivos em termos de contaminação.

PIMENTA e VILELA (2003) não detectaram a presença de ocratoxina A em amostras de grãos de café submetidos a diferentes tempos de repouso antes da secagem. Segundo GONÇALVEZ et al. (2001), isso pode ocorrer porque a ocratoxina A é um metabólito secundário produzido por fungos em resposta às condições ambientais.

Entretanto, em trabalhos realizados por diferentes autores foram detectados valores significativos de ocratoxinas. MICCO et al. (1989), avaliaram 627 amostras de grãos de café verde provenientes do Brasil, Costa Rica, México e África, e afirmaram que 56 amostras (9%), estavam contaminadas com ocratoxina A em níveis que variaram entre 0,5 e 360 ng/g.

FURLANI et al. (1998), analisaram 50 amostras de café verde provenientes do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Roraima e Bahia. Encontraram ocratoxina em 15 (30%) amostras, em níveis que variaram entre 0,8 ng/g a 117,4 ng/g.

PATEL et al. (1997) avaliaram a presença de ocratoxina A em 100 amostras de café solúvel comercializados na Inglaterra, reportando que 64 apresentaram níveis entre 0,1 ng/g e 8 ng/g.

Segundo PETERSON e SCHNÜRER (1995), a introdução de microrganismos capazes de crescer competindo e reduzindo o desenvolvimento de linhagens toxigênicas em grãos e alimentos de constitui uma alternativa viável para minimizar os prejuízos causados pelos fungos. BEUX (2004), avaliando a ação fungistática de leveduras e bactérias lácticas, isoladas de café cereja, contra *Aspergillus ochraceus*, produtor de ocratoxina, constatou que *Candida lambica* 13b e *Lactobacillus brevis* LPB 03 apresentam grande potencial antagônico. Sendo que *C. lambica* 13b reduziu em 88,37%

a formação de ocratoxina A, quando inoculada em grãos de café verde artificialmente contaminados com esporos de *A. ochraceus*.

O presente trabalho pretende, portanto, contribuir com o conhecimento da diversidade

da microbiota presente nos grãos de café, visando à identificação de espécies fúngicas que possam alterar o sabor da bebida e, ainda, produzir micotoxinas. O sabor da bebida é um importante fator a ser considerado quando de sua exportação e a manutenção de sabor e odor agradáveis é primordial para o consumo desta. A presença de micotoxinas nos grãos, por sua vez, leva a um problema de saúde pública, em que diversos efeitos tóxicos, pela ingestão das mesmas, podem ser deflagrados no homem e outros animais.

6. CONCLUSÕES

- O número de fungos isolados foi maior nos grãos de café da variedade IAPAR 59 provenientes da árvore do que do solo;
- No tempo 0 dias observou-se o maior número absoluto de fungos isolados de grãos coletados da árvore. No solo, este fato ocorreu no tempo 60 dias;
- Os gêneros isolados foram: *Acremonium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Penicillium*, *Absidia* e *Aspergillus*, sendo que este apresentou maior diversidade (12 morfotipos) e esteve presente na maior parte dos tempos de estudo, podendo estar relacionado com a piora na qualidade da bebida;
- O morfotipo *Aspergillus* sp1 apresentou a maior frequência de isolados da árvore e *Aspergillus* sp7 maior frequência de isolados no solo;
- Observou-se uma piora na qualidade da bebida de grãos coletados, tanto na árvore quanto no solo, em função da permanência dos mesmos em seus locais de origem;
- Foram encontrados elevados níveis de ocratoxina nos grãos de café, indicando que os gêneros isolados são, potencialmente, produtores de micotoxinas;
- Para a obtenção de uma bebida de melhor qualidade deve-se evitar a permanência prolongada dos grãos na árvore e no solo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AESCHBACH, M. K., REYNAUD, D. T., SCHOLZ, M. B., GABARDO, J., PIMENTEL, I. C. **Isolamento de fungos de grãos de café da variedade Iapar 59 associados à qualidade de bebida do café.** Curitiba: UFPR, 2004, p.48. (Monografia – Bacharel em Ciências Biológicas).

ALMEIDA, S. R. Doenças do cafeeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEIEIRO, 1. **Anais...** Poços de Caldas, MG, 1984. In: AESCHBACH, M. K., REYNAUD, D. T., SCHOLZ, M. B., GABARDO, J., PIMENTEL, I. C. **Isolamento de fungos de grãos de café da variedade Iapar 59 associados à qualidade de bebida do café.** Curitiba: UFPR, 2004, p.48. (Monografia – Bacharel em Ciências Biológicas).

ALVES, E. **População fúngica associada ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e as fases pré e pós colheita-relação com a bebida e local de cultivo.** Lavras: UFLA, 1996. p.48. (Dissertação-Mestrado em Fitopatologia).

AMORIM, H. V. **Relação entre alguns compostos orgânicos do grão de café verde com a qualidade da bebida.** Piracicaba: ESALQ, 1972. p.136. (Tese – Doutorado em Agronomia).

APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for examination of water and wastewater.** 21 ed. Washington, 2005.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4 ed. Washington, 2001. In: BEUX, M. R. **Café - estudo da diversidade microbiana de frutos de café do Brasil, seleção de cepas de leveduras e bactérias lácticas com ação fungistática contra *Aspergillus ochraceus* produtor de ocratoxina A.** Curitiba - UFPR, 2004, p.128. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos).

BAKER, P.S. La broca del café en Colombia. Informe final del proyecto MIP para el café. **Cenicafé-CABI Bioscience**, Chinchina, Colombia, p.154, 1999.

BARNETT, H. C., HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 3ed., Minneapolis: Burgess Publications, 1987.

BARRERA, J.F., P.S. BAKER, J.E. VALENZUELA, SCHWARZ, A. Introducción de dos especies de parasitoides africanos a México para el control biológico de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Folia Entomol. Mex.** 79: p.245-247, 1990.

BATISTA, L.R. **Identificação, potencial toxigênica e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L).** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. p.188. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos).

BENASSI, V. L. R. M. Levantamento dos inimigos naturais da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae), no norte do Espírito Santo. **An. Soc. Entomol. Brasil** 24: p.635-638, 1995.

BENASSI, V.L.R.M. **A broca-do-café**. Vitória, EMCAPA, p.63, (Documentos, 57), 1989.

BEUX, M. R. **Café** - estudo da diversidade microbiana de frutos de café do Brasil, seleção de cepas de leveduras e bactérias lácticas com ação fungistática contra *Aspergillus ochraceus* produtor de ocratoxina A. Curitiba - UFPR, 2004, p.128. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos).

BIBLIOTECA NACIONAL DO ESTUDANTE DE LÍNGUA PORTUGUESA (BIBVIRT). **Especiais Frutas No Brasil Café**. Disponível em <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br>> (acessado em 04/03/07)

BULLERMAN, L. B., SCHROEDER, L. L., PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **J. food prot.**, v.47, n.8, p.637-646, 1984.

BUSTILLO, A.E., R. CARDENAS, F.J. POSADA. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. **Neotrop. Entomol.** 31: 635-639, 2002.

CARNEIRO FILHO, F., SCHOLZ, M. B. S., CARAMORI, P. H., ANDROCIOLI FILHO, A., LIMA, F. B. **Estudo do aparecimento do gosto Rio no café em função do tempo de permanência dos frutos na lavoura**. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2. **Anais...** Vitória, ES. 2001.

CANTOR, F., BENASSI, V.L.R.M., FANTON, C.J. **Broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae)**, p.99-105, 2000. In E.F. VILELA, R.A., ZUCCHI F., CANTOR. (eds.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto, Holos, 173p.

CARVALHO, L. M., SILVA, E. A. M., AZEVEDO, A. A., MOSQUIM, P. R., CECON, P. R. Aspectos morfofisiológicos dos cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, 2001.

CARVALHO, V. D. de, CHALFOUN, S. M. **Cafeicultura, tecnologias de produção, gerenciamento e comercialização: Colheita, preparo e armazenamento** 1ª edição, Lavras: D4 videographics, 1999. CR-ROM.

CARVALHO, V. D. de, CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.11, n.126, p. 79-92, jun. 1997.

CARVALHO, V. D. et al. Relações entre a composição físico- química e química do grão beneficiado e da qualidade da bebida do café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v.29, n.3, p449-454, 1994.

CARVALHO, V.D., CHALFOUN, S.M., CHAGAS, S.J.R. **Relação entre classificação do café pela bebida e composição físico-químicas, química e microflora do grão**

beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15, 1989, Maringá, PR. **Anais...** Rio de Janeiro: MEC/IBC, 1989. p.25-26.

CAMARGO, R. de. Padronização do café. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v.48, p. 421-438, 1947.

CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. **Grain Storage the role of fungi in quality loss.** Minneapolis: University of minnesota, p.153, 1969.

CLARKE, R. J., MACRAE, R. (Ed.). **Coffee: Chemistry.** London: Elsevier, v.1., 1985.

COULOMBE, R. A. **Aflotoxins 1991.** In: KANIA, C. E. **isolamento e identificação de fungos associados ao café (*coffea arabica* L.) produzido por sistema orgânico e convencional da variedade de Iapar 59.** Curitiba - UFPR (Monografia – Bacharel em Ciências Biológicas) 2004.

CONAB: **Safras.** Disponível em < www.conab.gov.br/ > (acessado em 13/02/07)

DENTAM E. **Cafés riotés: etude microscopique du processus d'infection.** In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 13, 1989, Paipa. Proceedings... Paipa: ASIC, 1989, p.127-144.

EMBRAPA CAFÉ: **Histórico.** Disponível em < www.embrapa.br/cafe/ > (acessado em 17/04/07)

EVANGELISTA, A. W. P.; CARVALHO, L. G. de; SEDIYAMA, G. C. Zoneamento climático associado ao potencial produtivo da cultura do café no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** Campina Grande, v.6, n.3, p. 445-452, 2002.

FRANCO, B. D. G., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

FRAGOSO, D. B., GUEDES, R. N. C., LADEIRA, J. A Seleção na evolução de resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotrop. Entomol.**, Jun 2003, vol.32, no.2, p.329-334.

FREITAS, R.F. **Fungos associados a grãos de café (*Coffea arabica* L.) beneficiado de diversos municípios da região Sul de Minas Gerais.** Lavras: UFLA, p.95 (Dissertação-Mestrado em Ciência dos Alimentos). 2000.

FRISVAD, J. C., SAMSON, R. A. **Filamentous in foofs and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production.** In: KANIA, C. E. **isolamento e identificação de fungos associados ao café (*coffea arábica* L.) produzido por sistema orgânico e convencional da variedade de Iapar 59.** Curitiba - UFPR (Monografia – Bacharel em Ciências Biológicas) 2004.

FURLANI, R. P. Z., OLIVEIRA, P. L., SOARES, L. M. V. Incidência de ocratoxina A em café verde proveniente de várias regiões produtora brasileiras. In: BEUX, M. R. **Café** - estudo da diversidade microbiana de frutos de café do Brasil, seleção de cepas de leveduras e bactérias lácticas com ação fungistática contra *Aspergillus ochraceus* produtor de ocratoxina A. Curitiba - UFPR, 2004, p.128. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos).

GARCIA JÚNIOR, D., POZZA, E. A., SOUZA, P. E. de, TALAMINI, V., POZZA, A. A., CASTRO, H. A. de, SOUZA, R. M. de, ABREU, M. S. de, PFENNING, L. H. Frequência de ocorrência de agentes etiológicos, sintomas e origem de amostras do cafeeiro catalogados em 12 anos de clínica fitossanitária da UFLA. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.173-177, jan./fev., 2003.

GONÇALVEZ, E., PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, São Paulo, v.63, n1/2, p.15-19, jan./dez.,2001.

GUHARAY, J., MONTERREY, J.. Manejo ecológico de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*) en America Central. **Man. Int. Plagas** 22: 1-7, 1997.

HAZEN, E. L., GORDON, M. A., REED, F. C. Laboratory identification of pathogenic fungi simplified. 3 ed, Springfield (USA): **Charles C. Thomas**, 1973.

HERRERA, T., ULLOA, M. **El reino de los hongos**. Micología básica y aplicada. 1 ed, México, 1990.

IBC/GERCA. – **Cultura de café no Brasil**: Manual de recomendações. 4 ed. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 504 p.1981.

IAPAR: **Café** - Disponível em <<http://www.pr.gov.br/iapar/cafe/iapar59.html>> (acessado em 18/10/07)

ILLY, A., VIANI, R. **Expresso coffe: the chemistry of quality**. San Diego: Academic Press, 1995. In MALTA, M. R., SANTOS, M. L., SILVA, F. A. M. Qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.5, p.1385-1390, 2002.

KARASAWA, S., FARIA, M. A. de, GUIMARÃES, R. J. Resposta do cafeeiro cv. Topázio MG-1190 submetido a diferentes tempos de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n.1, p.28-34, 2002.

KERN, M. E., BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas**. 2 ed, São Paulo: Editorial Premier, 1999.

KERN, M. E. **Medical mycology**: A self- instructional text. 3 ed. Philadelphia: F.A. Davis Company, 1988.

KLICH, M. A., PITT, J. I. **Common *Aspergillus* Species and their Teleomorphs.** Austrália: Commonwealth Scientific and Industrial research Organization, p.116, 1988.

KONEMAN, E. W., ROBERTS, G. D. **Micologia prática de laboratório.** Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2001.

KRUG, H. P. A origem dos cafés duros. **Boletim de Agricultura**, São Paulo, v. 48, p. 397-406, 1947.

KRUG, H. P. Cafés duros II: um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição. **Revista do Instituto de Café**, v. 15, p. 1393-1396, 1940.

LARONE, D. H. **Medically important fungi:** A guide to identification. 2 ed. New York: Elsevier, 1987.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações.** 2 ed. Curitiba: Paranaset, 1997.

LE PELLEY, R.H. **Pests of coffee.** London, Longman, p.590, 1968

LOPES, L. M. V. **Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000. In: MALTA, M. R., Santos, M. L., Silva F. A. M. Qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.5, p.1385-1390, 2002.

LUNA-FILHO, E. P. **Cafés do Brasil e indicações geográficas.** Disponível em <<http://www.coffeefreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=99>>. (Acessado em 16/06/07)

MACHADO, C. M. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico- GA3) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros:** relação da produção de GA3 em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*). Curitiba – UFPR, p.95. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), 2002. In: BEUX, M. R. **Café** - estudo da diversidade microbiana de frutos de café do Brasil, seleção de cepas de leveduras e bactérias lácticas com ação fungistática contra *Aspergillus ochraceus* produtor de ocratoxina A. Curitiba - UFPR, 2004, p.128. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos).

MALLOZZI, A. B., CORRÊA, B. Fungos toxigênicos e micotoxinas. **Bol. Técn. Inst. Biol.**, São Paulo, n.12, p.5-26, 1998.

MEIRELLES, A.M.A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais.** Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, p.71. (Dissertação - Mestrado em Agronomia), 1990.

- MENEZES, M., OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos fitopatogênicos**. Pernambuco: UFRPE (imprensa Universitária), 1993.
- MICCO, C., GROSSI, M., MIRAGLIA, M., BRERA, C. A study the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. **Food Additives and Contaminants**, Hants, v.6, n.3, p.333-339, 1989.
- MISLIVEC, P. B., BRUCE, V. R., GIBSON, R. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. **Journal of Food Protection**, Washington, v.46, n.11, p.969-973, 1987.
- ORMOND, J. G. P, PAULA S. R. L., FILHO, P. F. **Café: (re) conquistas dos mercados**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 10, p. 3-56, set. 1999.
- PATEL, S., HAZEL, C. M., WINTERTON, A. G. M., GLEADLE, A. survey of ocratoxin A in UK retail coffees. **Food Additives and Contaminants**, v.14, n.3, p.217 – 222, 1997.
- PAULA, E. M., SAKIYAMA, C. C. H., PITTA FILHO, O. P. L., BORGES, A.C., SILVA, D. O. Comparação da microbiota da superfície de frutos de café (*Coffea arabica* L.) colhidos em duas localidades. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1. **RESUMOS...** Brasília, DF. 1984.
- PERIOTO, N. W., LARA R. I. R., SELEGATTO, E. S. Himenópteros parasitóides (insecta, hymenoptera) coletados em cultura de café *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) em ribeirão preto, SP, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São paulo, v.71, p.41-44, jan;mar., 2004.
- PETERSSON, S., SCHNÜRER, J. Biocontrol of mold growth in hight-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.3, 1995.
- PETTIGREW, J. **Café**. São Paulo: Nobel, 1999.
- PEZZINI, V., VALDUGA, E., CANSIANI, R. L. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho e armazenados sob diferentes condições. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 64(1). P.91-96, 2005
- PIMENTA, C. J., CHALFOUN, S. M. Composição microbiana associada ao café coco e beneficiado colhido em diferentes estádios de maturação. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.3, p. 677-682, mai./jun., 2001.
- PIMENTA, J. C., VILELA E.R. Composição microbiana e ocratoxina no café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes tempos de espera de secagem. **Ciê. Agrotec.**, Lavras. V.27, n.6, nov./dez, 2003.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 13 ed. São Paulo: Nobel, p.468, 1990.

PINTO, N. A. V. D., FERNANDES, S. M., PIRES, T. C., PEREIRA, R. G. F. A., CARVALHO, V. D. de. Avaliação dos polifenóis e açúcares em padrões do café torrado tipo expresso. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, n.3, p.193-195, set./dez. 2001.

PRADO, G., OLIVEIRA, M. S. de, ABRANTES, F. M., SANTOS, L. G. dos, VELOSO, T., BARROSO, R. E. de S. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n.2, p.192-196, mai./ago., 2000.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. p. 19-22.

SMITH, J. E., HENDERSON, R. S. **Mycotoxins and animal foods**. London: CRC Press, p.816-841, 1991.

SOARES, L. V. **Ocratoxinas e Aflatoxinas em cafés brasileiros**. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE BIOTECNOLOGIA NA AGROINDÚSTRIA CAFEEIRA, 3., 2000, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR/IRD, p. 447-452, 2000.

SOUZA, J. C., REIS, P. R., RIGITANO, R. L. O. **Bicho-mineiro-do-cafeeiro**: biologia, danos e manejo integrado. Belo Horizonte, EPAMIG, 48p., 1998. In: FRAGOSO, D. B., GUEDES, R. N. C., LADEIRA, J. A Seleção na evolução de resistência a organofosforados em *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotrop. Entomol.**, vol.32, no.2, p.329-334, Jun. 2003.

SOUZA, J.C., REIS, P.R.. **Broca-do-café**: Histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle. 2. ed. Belo Horizonte, EPAMIG, p.40, (Boletim Técnico, 50), 1997.

SPADONE, J.C., TAKEOKA, G., LIARDON, R. Analytical investigation of Rio off-flavor in green coffee. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. V.38, p. 226-233, 1990.

STUDER-ROHR, I. **Ochratoxin in green and roasted coffee beans**. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLOQUIUM OF BEANS, 15, Montpellier.Bern, p. 6-11, 1994.

TORTORA, G., FUNKE, B., CASE, C. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, p.872, 2005.

VÁRZEA, V.M.P., RODRIGUES JR, C.J., SILVA, M.C.M.L., GOUVEIA, M., MARQUES, D.V., GUERRA-GUIMARÃES, L., RIBEIRO, A. In: PETEK, M. R. et al. Seleção de progênies de *Coffea arabica* com resistência simultânea á mancha aureolada e á ferrugem alaranjada. **Bragantia**, vol.65, no.1, p.65-73, 2006.

WATSON, D. H. **Natural toxicants in food**. Chichester: Ellis Horwood, p.232-247, 1987.

WOSIACK, G. **Produção de enzimas hidrolíticas por fungos isolados do café**. Curitiba - UFPR, p.33. (Dissertação-Mestrado), 1971.

ANEXOS

TABELA 1- PORCENTAGEM E NÚMERO ABSOLUTO DE FUNGOS ISOLADOS DO GRÃO DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 PROVENIENTE DA ÁRVORE EM DIFERENTES TEMPOS DE COLHEITA.

ÁRVORE	0 dias		30 dias		60 dias		90 dias		120 dias	
GÊNEROS	N ¹	% ²	N ¹	% ²	N ¹	% ²	N ¹	% ²	N ¹	% ²
<i>Acremonium</i> sp.	5	0,09	30	0,56	19	0,35	0	0	28	0,52
<i>Fusarium</i> sp.	2	0,04	4	0,07	4	0,07	24	0,44	9	0,16
<i>Paecilomyces</i> sp.	0	0	3	0,06	6	0,11	0	0	0	0
<i>Mucor</i> sp1	0	0	2	0,04	2	0,04	12	0,22	58	1,08
<i>Mucor</i> sp2	1	0,02	1	0,02	0	0	6	0,11	9	0,16
<i>Penicillium</i> sp1	3	0,06	0	0	8	0,15	2	0,04	3	0,06
<i>Penicillium</i> sp2	1	0,02	10	0,18	0	0	1	0,02	2	0,04
<i>Penicillium</i> sp3	10	0,18	0	0	1	0,02	0	0	3	0,06
<i>Aspergillus</i> sp1	1032	19,14	872	16,17	385	7,14	144	2,67	232	4,3
<i>Aspergillus</i> sp2	16	0,3	11	0,2	11	0,2	3	0,06	6	0,11
<i>Aspergillus</i> sp3	384	7,12	3	0,06	28	0,52	5	0,09	11	0,2
<i>Aspergillus</i> sp4	12	0,22	0	0	0	0	0	0	4	0,07
<i>Aspergillus</i> sp5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i> sp6	5	0,09	3	0,06	2	0,04	0	0	3	0,06
<i>Aspergillus</i> sp7	29	0,54	18	0,33	28	0,52	16	0,3	18	0,33
<i>Aspergillus</i> sp8	0	0	3	0,06	4	0,07	0	0	3	0,06
<i>Aspergillus</i> sp9	59	1,1	41	0,76	0	0	0	0	4	0,07
<i>Aspergillus</i> sp10	740	13,72	144	2,67	53	0,98	80	1,48	54	1
<i>Aspergillus</i> sp11	45	0,83	34	0,63	32	0,59	27	0,5	0	0
<i>Aspergillus</i> sp12	95	1,76	301	5,58	64	1,19	28	0,52	29	0,54
<i>Absidia</i> sp.	0	0	0	0	1	0,02	1	0,02	1	0,02
TOTAL	5393					% = 100,0				

¹ N= Número absoluto de fungos isolados do grão provenientes da árvore.

² %= Porcentagem de fungos isolados do grão provenientes da árvore.

TABELA 2 - PORCENTAGEM E NÚMERO ABSOLUTO DE FUNGOS ISOLADOS DO GRÃO DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 PROVENIENTE DO SOLO EM DIFERENTES TEMPOS DE COLHEITA.

SOLO	0 dias		30 dias		60 dias		90 dias		120 dias	
GÊNERO	N ¹	% ²	N ¹	% ²	N ¹	% ²	N ¹	% ²	N ¹	% ²
<i>Acremonium</i> sp.	28	1,84	22	1,44	14	0,92	12	0,79	11	0,72
<i>Fusarium</i> sp.	3	0,2	0	0	1	0,06	2	0,13	7	0,46
<i>Paecilomyces</i> sp.	0	0	2	0,13	3	0,2	0	0	1	0,06
<i>Mucor</i> sp1	102	6,7	10	0,66	24	1,57	20	1,32	4	0,27
<i>Mucor</i> sp2	4	0,27	3	0,2	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium</i> sp1	0	0	5	0,33	2	0,13	0	0	2	0,13
<i>Penicillium</i> sp2	3	0,2	2	0,13	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium</i> sp3	0	0	0	0	1	0,06	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i> sp1	154	10,11	11	0,72	13	0,86	8	0,52	1	0,06
<i>Aspergillus</i> sp2	7	0,46	1	0,06	2	0,13	1	0,06	0	0
<i>Aspergillus</i> sp3	20	1,32	5	0,33	5	0,33	21	1,38	8	0,52
<i>Aspergillus</i> sp4	3	0,2	1	0,06	4	0,27	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i> sp5	2	0,13	0	0	0	0	2	0,13	0	0
<i>Aspergillus</i> sp6	2	0,13	1	0,06	18	1,19	10	0,66	1	0,06
<i>Aspergillus</i> sp7	18	1,19	20	1,32	306	20,1	7	0,46	1	0,06
<i>Aspergillus</i> sp8	3	0,2	1	0,06	0	0	0	0	1	0,06
<i>Aspergillus</i> sp9	2	0,13	0	0	2	0,13	2	0,13	1	0,06
<i>Aspergillus</i> sp10	106	6,96	45	2,96	295	19,37	23	1,51	12	0,79
<i>Aspergillus</i> sp11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus</i> sp12	49	3,22	21	1,38	6	0,39	9	0,59	3	0,2
<i>Absidia</i> sp.	1	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	1523					% = 100,0				

¹ N= Número absoluto de fungos isolados do grão provenientes do solo.

² %= Porcentagem de fungos isolados do grão provenientes do solo.

TABELA 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS FUNGOS TOTAIS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DE DIFERENTES ORIGENS E TEMPOS DE COLHEITA.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator 1 (F1)	1	11,27797	11,27797	171,5196 **

Fator 2 (F2)	4	11,85341	2,96335	45,0678 **
Int. F1XF2	4	3,30122	0,8253	12,5515 **
Resíduo	150	9,86299	0,06575	
Total	159	36,29559		

CV% = 19,49813

** Significativo ao nível de probabilidade de 1%

TABELA 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O GÊNERO *Penicillium* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DE DIFERENTES ORIGENS E TEMPOS DE COLHEITA.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator 1 (F1)	1	0,00454	0,00454	0,4775 ns
Fator 2 (F2)	4	0,06564	0,01641	1,7276 ns
Int. F1XF2	4	0,03219	0,00805	0,8472 ns
Resíduo	150	1,42495	0,0095	
Total	159	1,52732		

CV% = 29,29542

ns = não significativo

TABELA 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O GÊNERO *Paecilomyces* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DE DIFERENTES ORIGENS E TEMPOS DE COLHEITA.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator 1 (F1)	1	0,00017	0,00017	0,0379 ns
Fator 2 (F2)	4	0,03419	0,00855	1,9296 ns
Int. F1XF2	4	0,0294	0,00074	0,1659 ns
Resíduo	150	0,66449	0,00443	
Total	159	0,70179		

CV% = 21,19792

ns = não significativo

TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O GÊNERO *Acremonium* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DE DIFERENTES ORIGENS E TEMPOS DE COLHEITA.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
------	------	------	------	---

Fator 1 (F1)	1	0,17368	0,17368	9,5057 **
Fator 2 (F2)	4	0,09032	0,02258	1,2359 ns
Int. F1XF2	4	0,09992	0,02498	1,3672 ns
Resíduo	150	2,74061	0,01827	
Total	159	3,10452		

CV% = 36,53397

ns = não significativo

** Significativo ao nível de probabilidade de 1%

TABELA 7 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O GÊNERO *Mucor* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DE DIFERENTES ORIGENS E TEMPOS DE COLHEITA.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator 1 (F1)	1	0,36184	0,36184	18,8743 **
Fator 2 (F2)	4	0,6182	0,15455	8,0616 **
Int. F1XF2	4	2,48682	0,6217	32,4290 **
Resíduo	150	2,87569	0,01917	
Total	159	6,34255		

CV% = 30,92616

** Significativo ao nível de probabilidade de 1%

TABELA 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O GÊNERO *Fusarium* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DE DIFERENTES ORIGENS E TEMPOS DE COLHEITA.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator 1 (F1)	1	0,02643	0,02643	4,2257 **
Fator 2 (F2)	4	0,13376	0,03344	5,3458 **
Int. F1XF2	4	0,11166	0,02792	4,4626 **
Resíduo	150	0,93832	0,00626	
Total	159	1,21017		

CV% = 23,83884

** Significativo ao nível de probabilidade de 1%

TABELA 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O GÊNERO *Aspergillus* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DE DIFERENTES ORIGENS E TEMPOS DE COLHEITA.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Fator 1 (F1)	1	14,56549	14,56549	180,5010 **
Fator 2 (F2)	4	13,77536	3,44384	42,6774 **
Int. F1XF2	4	3,64178	0,91045	11,2826 **
Resíduo	150	12,10422	0,08069	
Total	159	44,08686		

CV% = 22,98359

** Significativo ao nível de probabilidade de 1%

TABELA 10 - TESTE DE TUKEY DOS FUNGOS TOTAIS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DA ÁRVORE EM DIFERENTES TEMPOS DE COLHEITA.

INTERAÇÃO ENTRE TEMPO/LOCAL (1) - ÁRVORE		
TEMPO (DIAS)	MÉDIA	SIGNIFICÂNCIA
0	2,0297	A
30	1,7955	A
60	1,5303	B
120	1,2946	BC
90	1,2529	C

TABELA 11 - TESTE DE TUKEY DOS FUNGOS TOTAIS ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DO SOLO EM DIFERENTES TEMPOS DE COLHEITA.

INTERAÇÃO ENTRE TEMPO/LOCAL (2) - SOLO		
TEMPO (DIAS)	MÉDIA	SIGNIFICÂNCIA
60	1,4569	A
0	1,3833	A
90	0,8941	B
30	0,889	B
120	0,6249	C

TABELA 12 - TESTE DE TUKEY PARA O GÊNERO *Mucor* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DA ÁRVORE EM DIFERENTES TEMPOS DE COLHEITA.

INTERAÇÃO ENTRE TEMPO/LOCAL (1) - ÁRVORE		
TEMPO (DIAS)	MÉDIA	SIGNIFICÂNCIA
120	0,615	A

90	0,4497	B
60	0,323	BC
30	0,312	C
0	0,301	C

TABELA 13 - TESTE DE TUKEY PARA O GÊNERO *Mucor* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DO SOLO EM DIFERENTES TEMPOS DE COLHEITA.

INTERAÇÃO ENTRE TEMPO/LOCAL (2) - SOLO		
TEMPO (DIAS)	MÉDIA	SIGNIFICÂNCIA
0	0,7893	A
60	0,5363	B
90	0,4313	BC
30	0,4076	BC
120	0,3419	C

TABELA 14 - TESTE DE TUKEY PARA O GÊNERO *Fusarium* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DA ÁRVORE EM DIFERENTES TEMPOS DE COLHEITA.

INTERAÇÃO ENTRE TEMPO/LOCAL (1) - ÁRVORE		
TEMPO (DIAS)	MÉDIA	SIGNIFICÂNCIA
90	0,442	A
120	0,3451	B
60	0,323	B
30	0,312	B
0	0,301	B

TABELA 15 - TESTE DE TUKEY PARA O GÊNERO *Fusarium* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DO SOLO EM DIFERENTES TEMPOS DE COLHEITA.

INTERAÇÃO ENTRE TEMPO/LOCAL (2) - SOLO		
TEMPO (DIAS)	MÉDIA	SIGNIFICÂNCIA

120	0,3607	A
60	0,3198	A
90	0,312	A
60	0,301	A
30	0,301	A

TABELA 16 - TESTE DE TUKEY PARA O GÊNERO *Aspergillus* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DA ÁRVORE EM DIFERENTES TEMPOS DE COLHEITA.

INTERAÇÃO ENTRE TEMPO/LOCAL (1) - ÁRVORE		
TEMPO (DIAS)	MÉDIA	SIGNIFICÂNCIA
0	2,0297	A
30	1,7893	A
60	1,5117	B
120	1,1802	C
90	1,1774	C

TABELA 17 - TESTE DE TUKEY PARA O GÊNERO *Aspergillus* sp. ISOLADOS DOS GRÃOS DE CAFÉ DA VARIEDADE IAPAR 59 DO SOLO EM DIFERENTES TEMPOS DE COLHEITA.

INTERAÇÃO ENTRE TEMPO/LOCAL (2) - SOLO		
TEMPO (DIAS)	MÉDIA	SIGNIFICÂNCIA
60	1,3666	A
0	1,2529	A
90	0,7738	B
60	0,7737	B
120	0,5042	B

FIGURA 18 – *Absidia* sp. isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

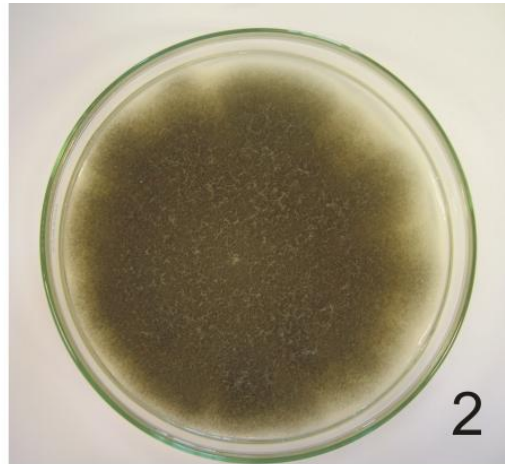
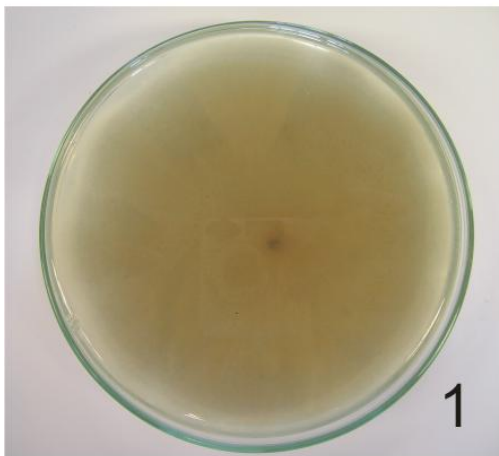


FIGURA 19 – *Acremonium* sp. isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.
- 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura de micélio e conidióforos em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 2000X.

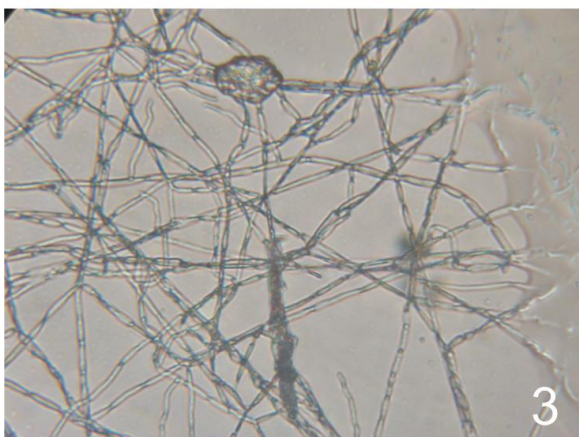
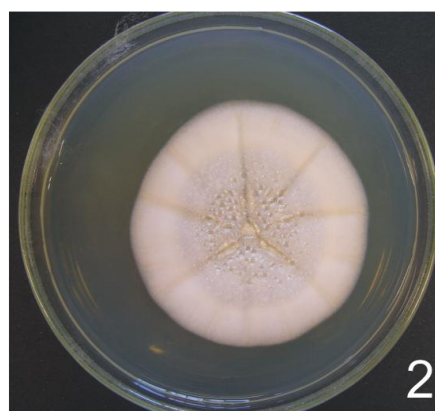
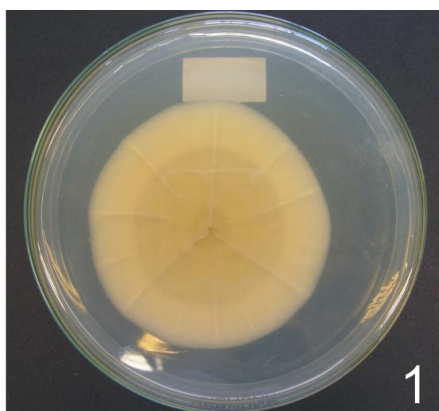


FIGURA 20 – *Aspergillus* sp1 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

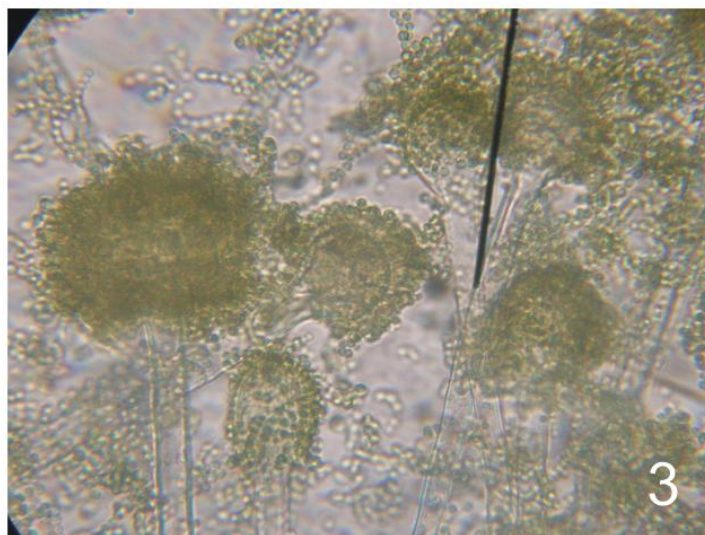
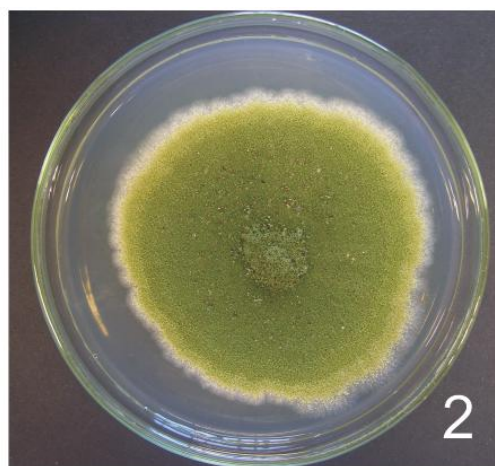
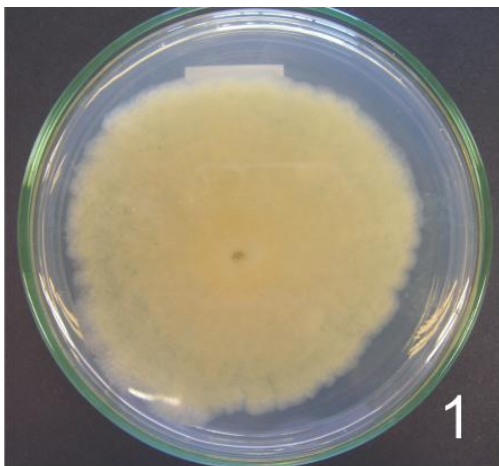


FIGURA 21 – *Aspergillus* sp2 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

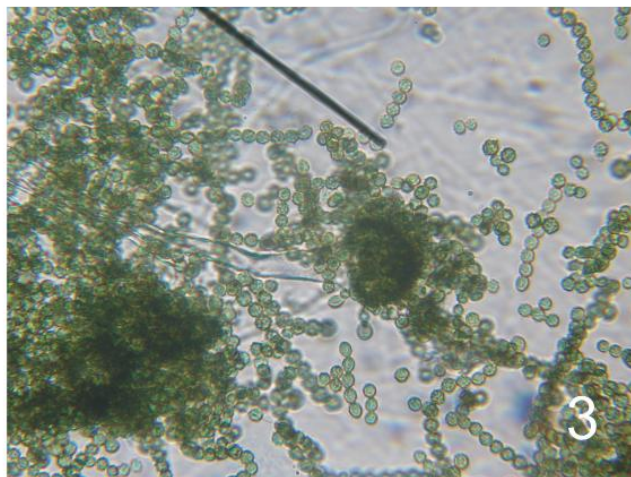
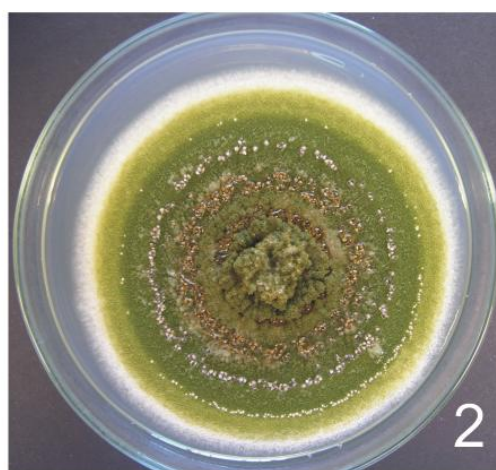
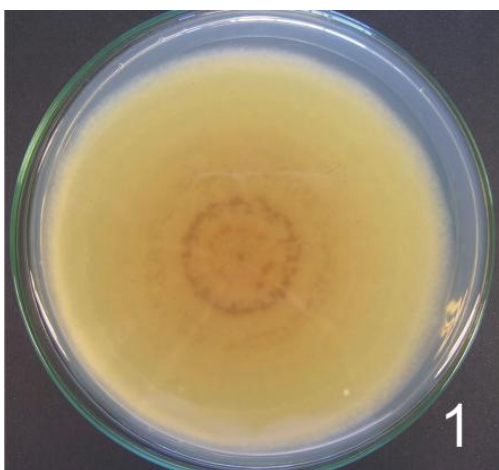


FIGURA 22 – *Aspergillus* sp3 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

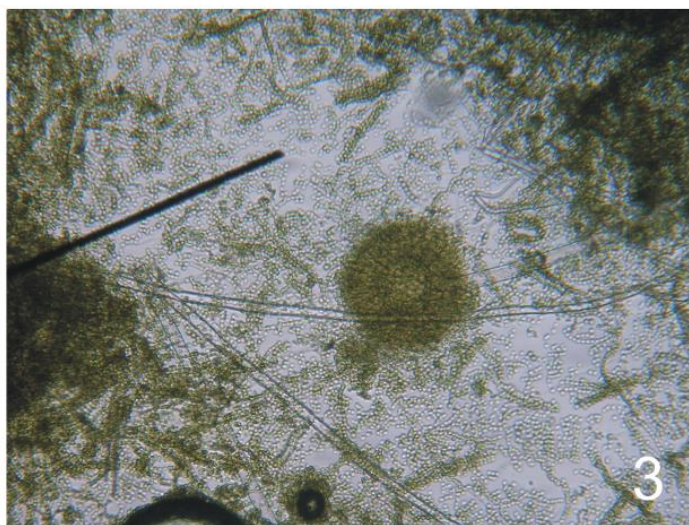
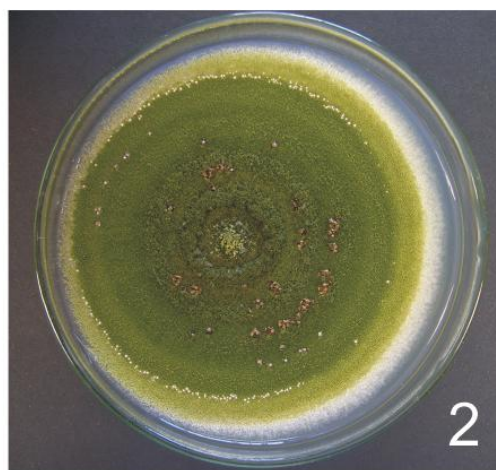
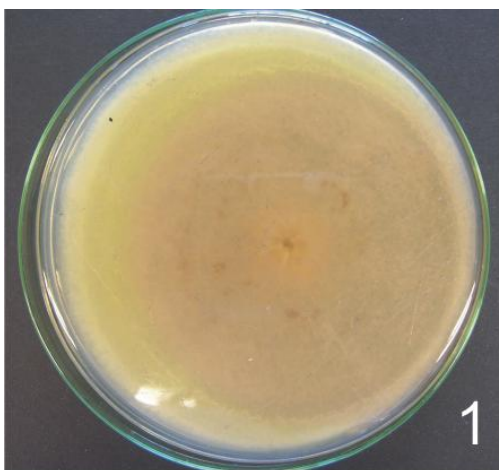


FIGURA 23 – *Aspergillus sp4* isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

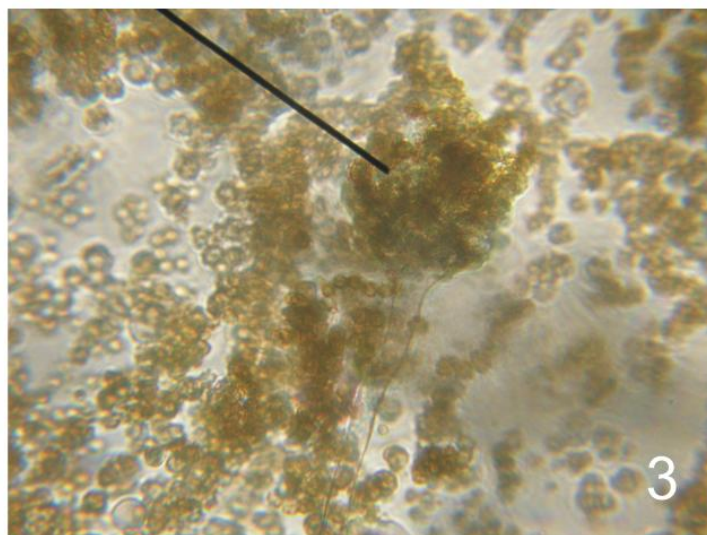
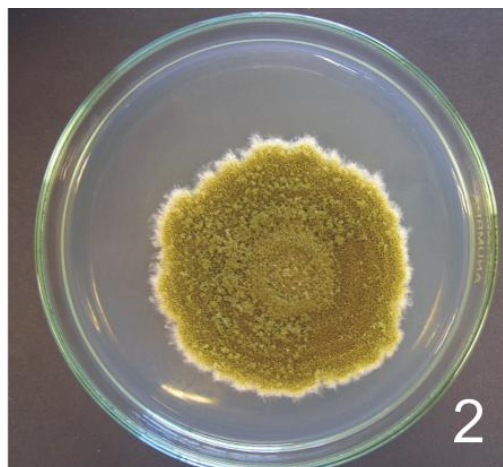
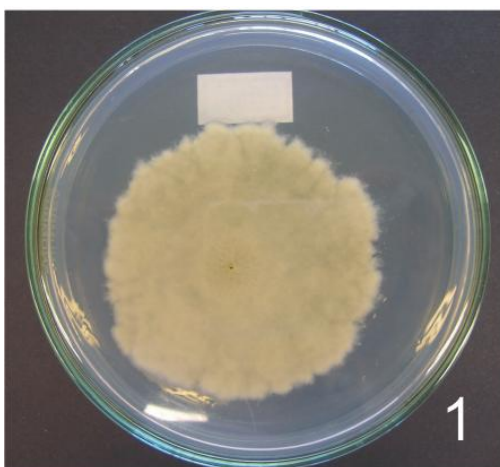


FIGURA 24 – *Aspergillus* sp5 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

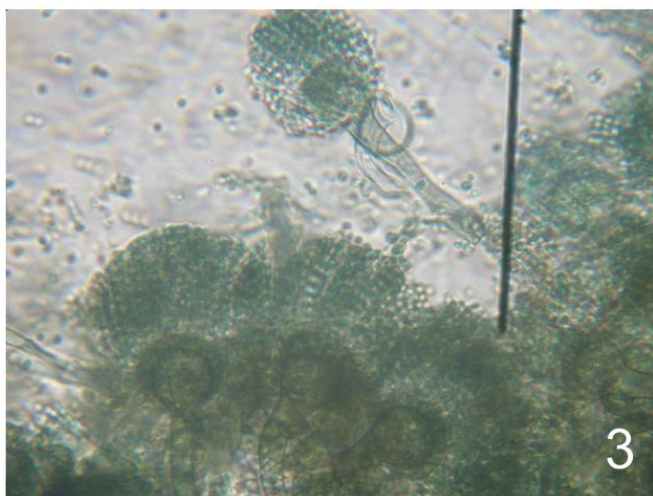
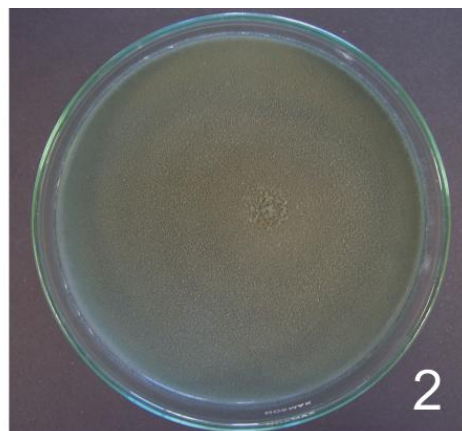
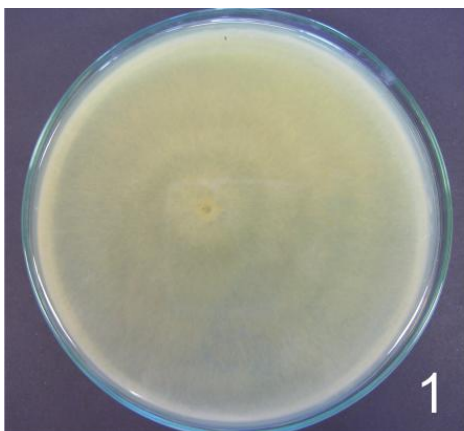


FIGURA 25 – *Aspergillus* sp6 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

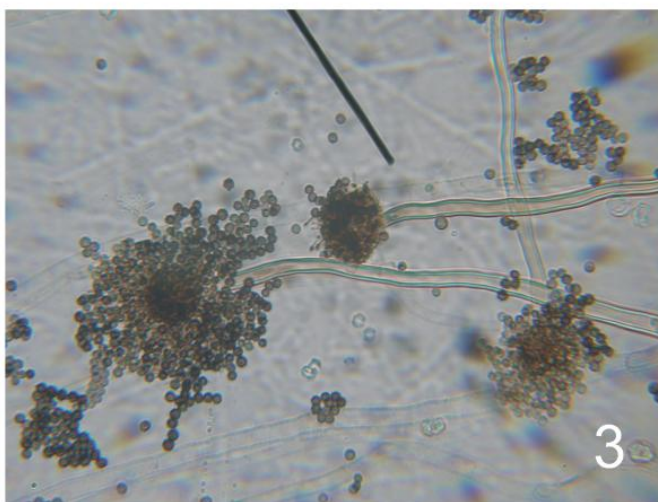
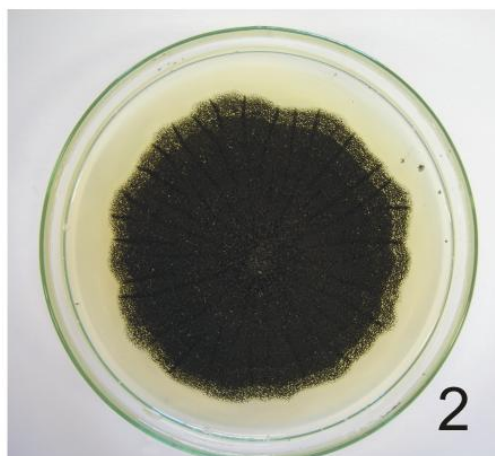
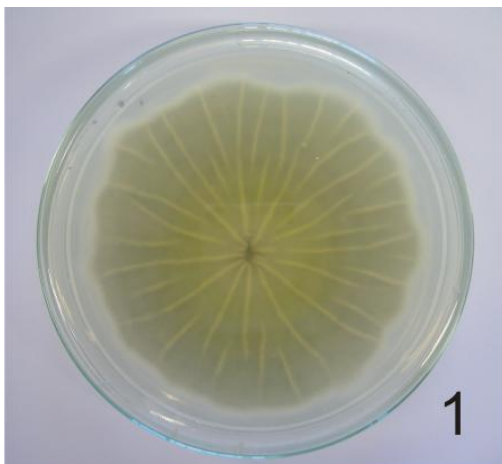


FIGURA 26 – *Aspergillus* sp7 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

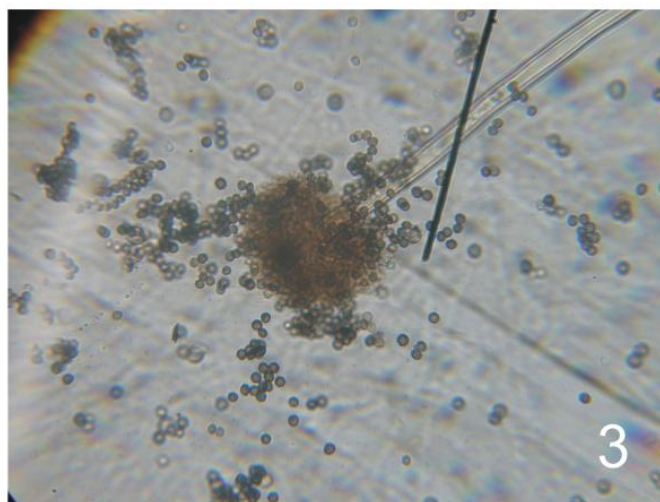
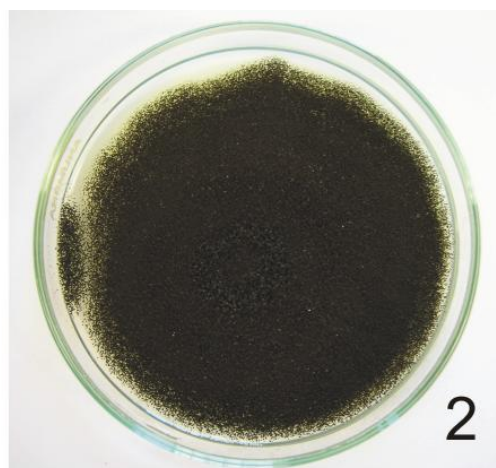
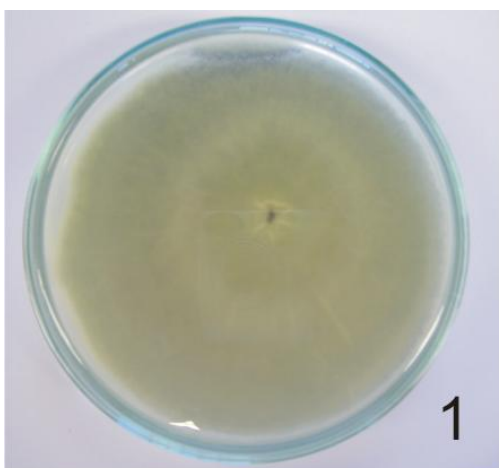


FIGURA 27 – *Aspergillus* sp8 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura de conidióforo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 2500X.

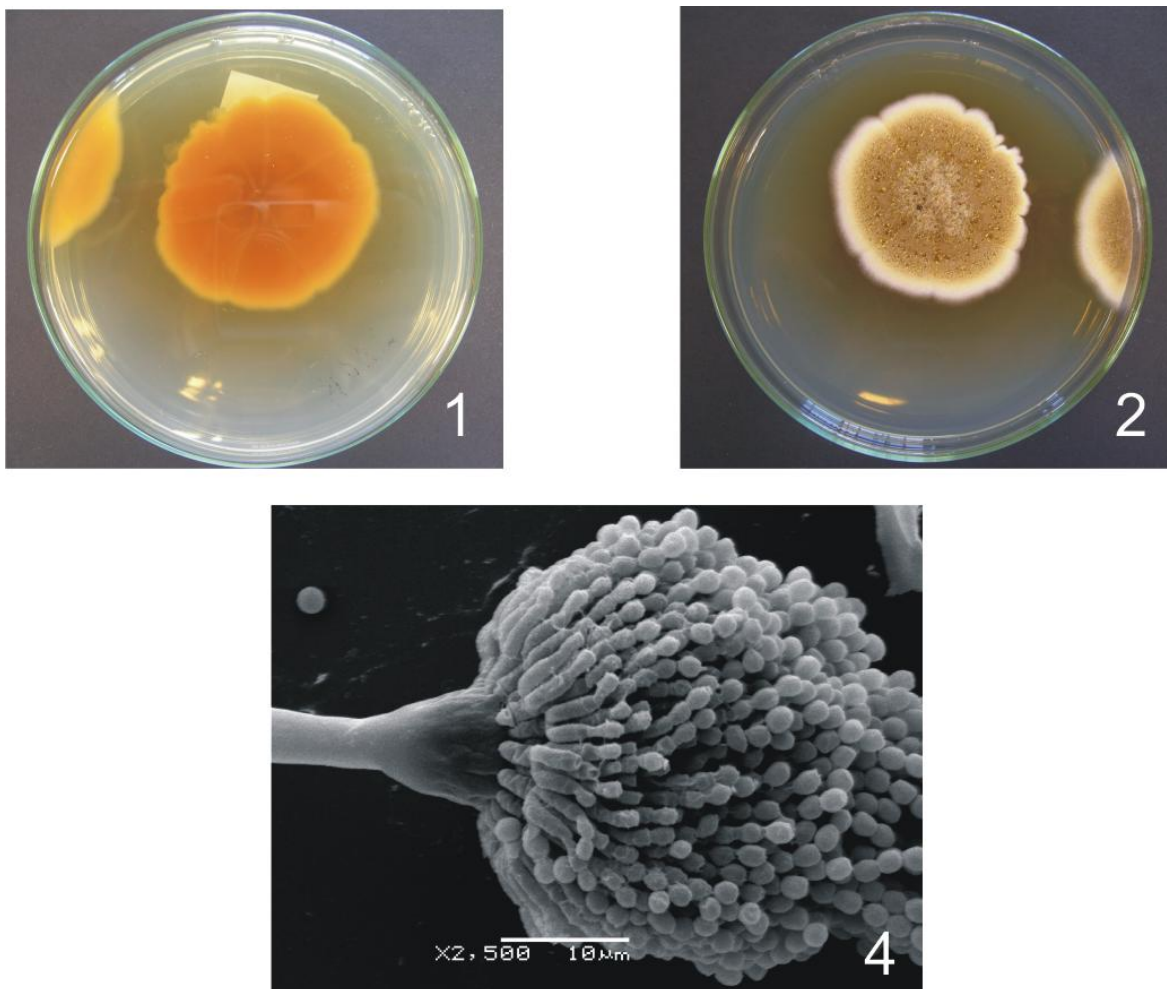


FIGURA 28 – *Aspergillus* sp9 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

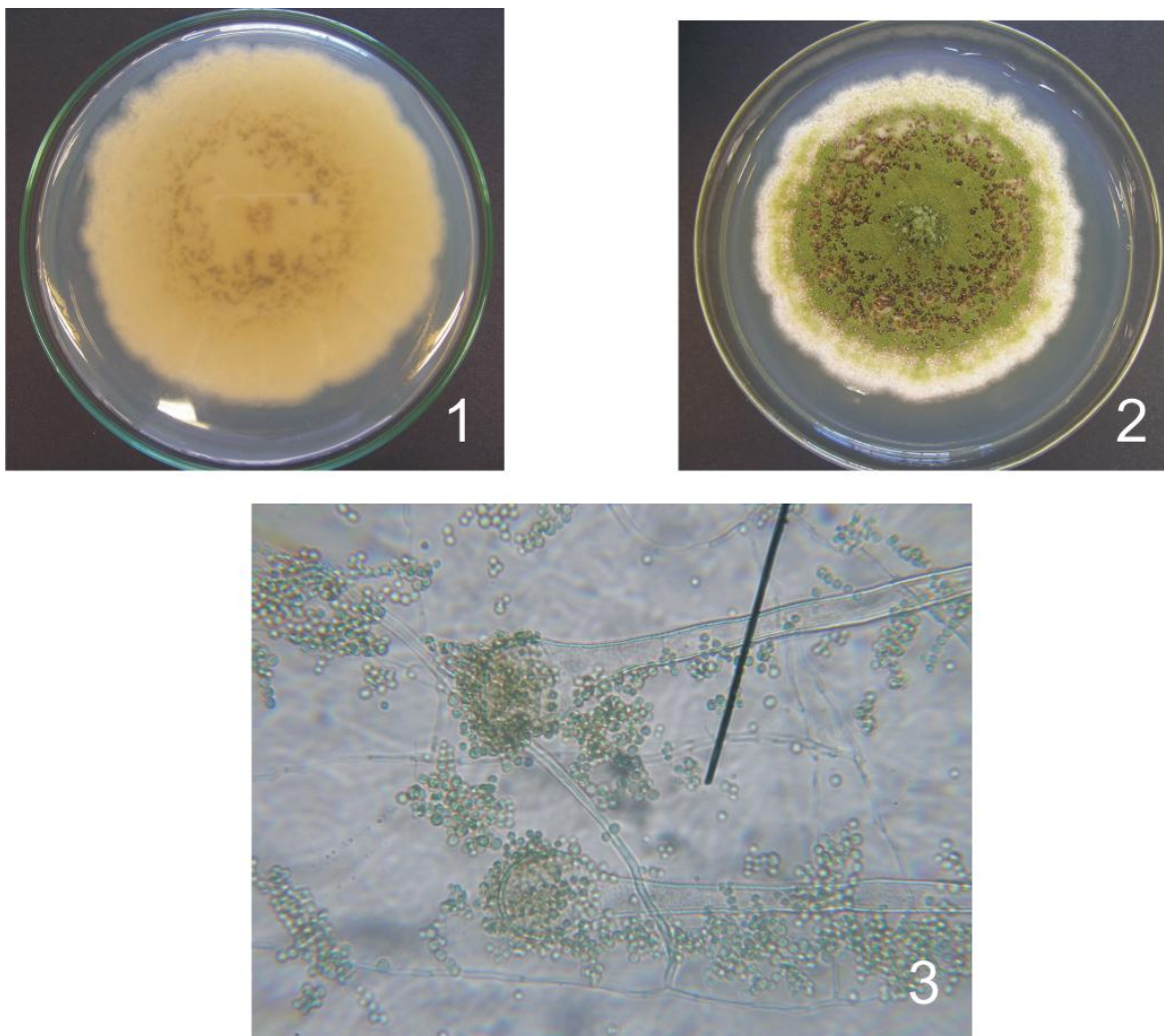


FIGURA 29 – *Aspergillus* sp10 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

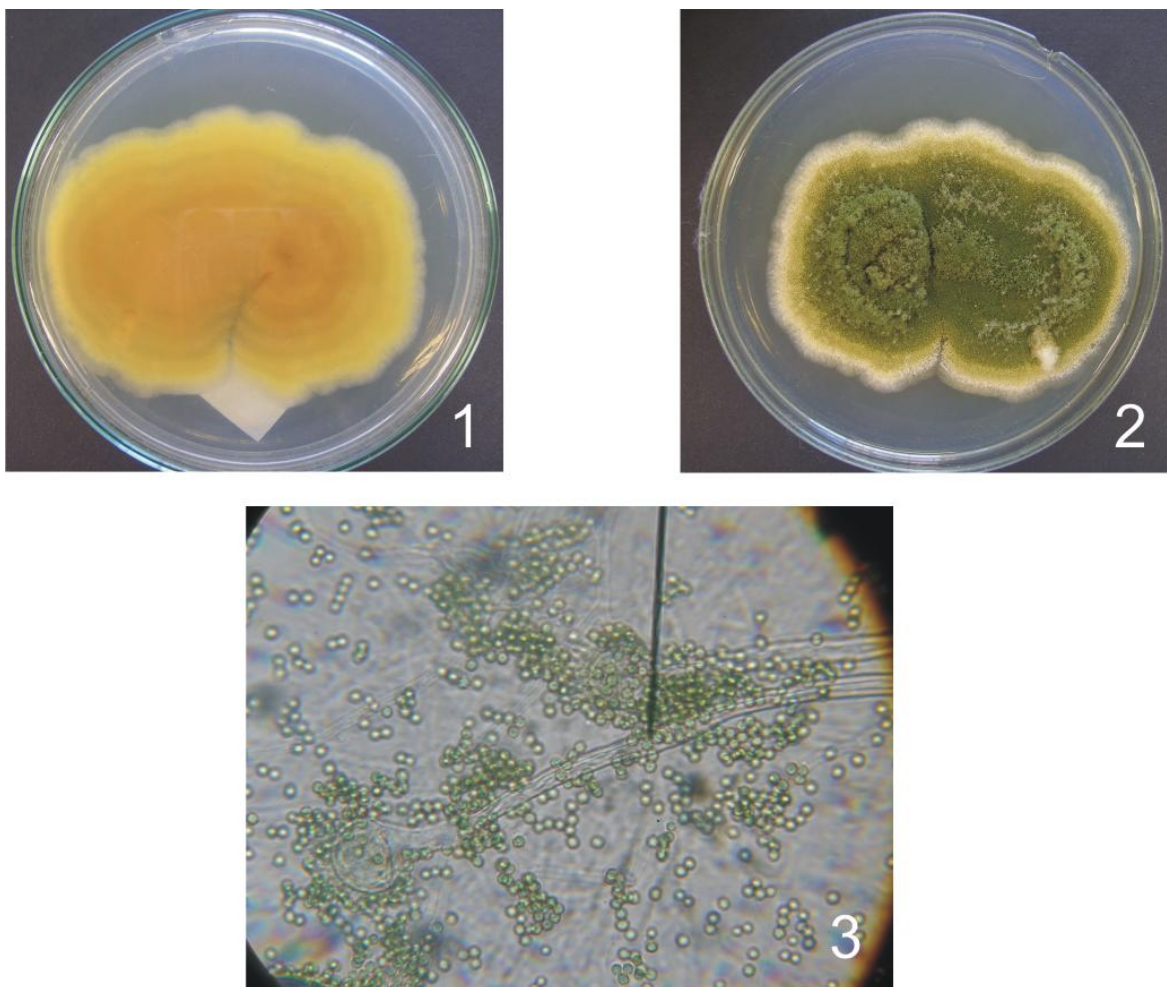


FIGURA 30 – *Aspergillus* sp11 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

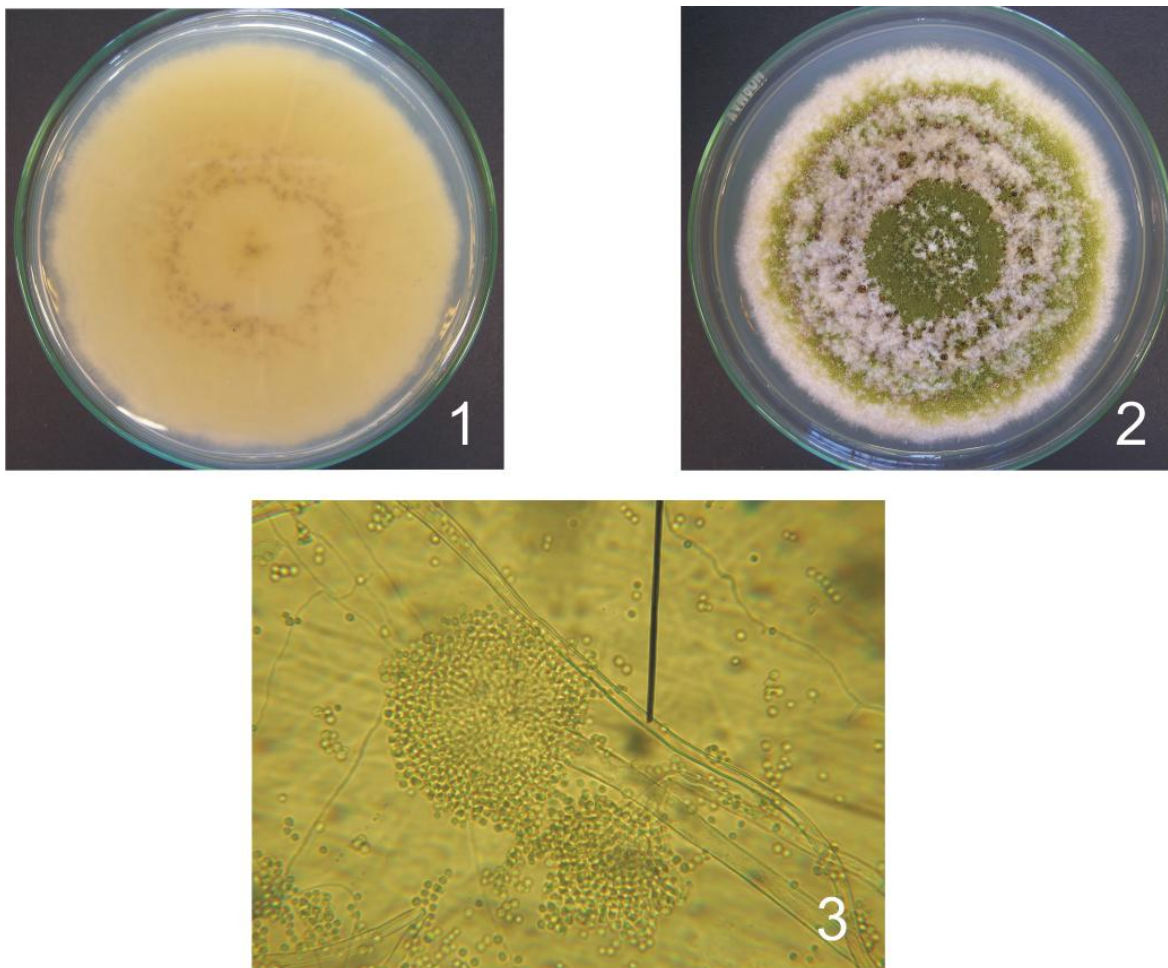


FIGURA 31 – *Aspergillus* sp12 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

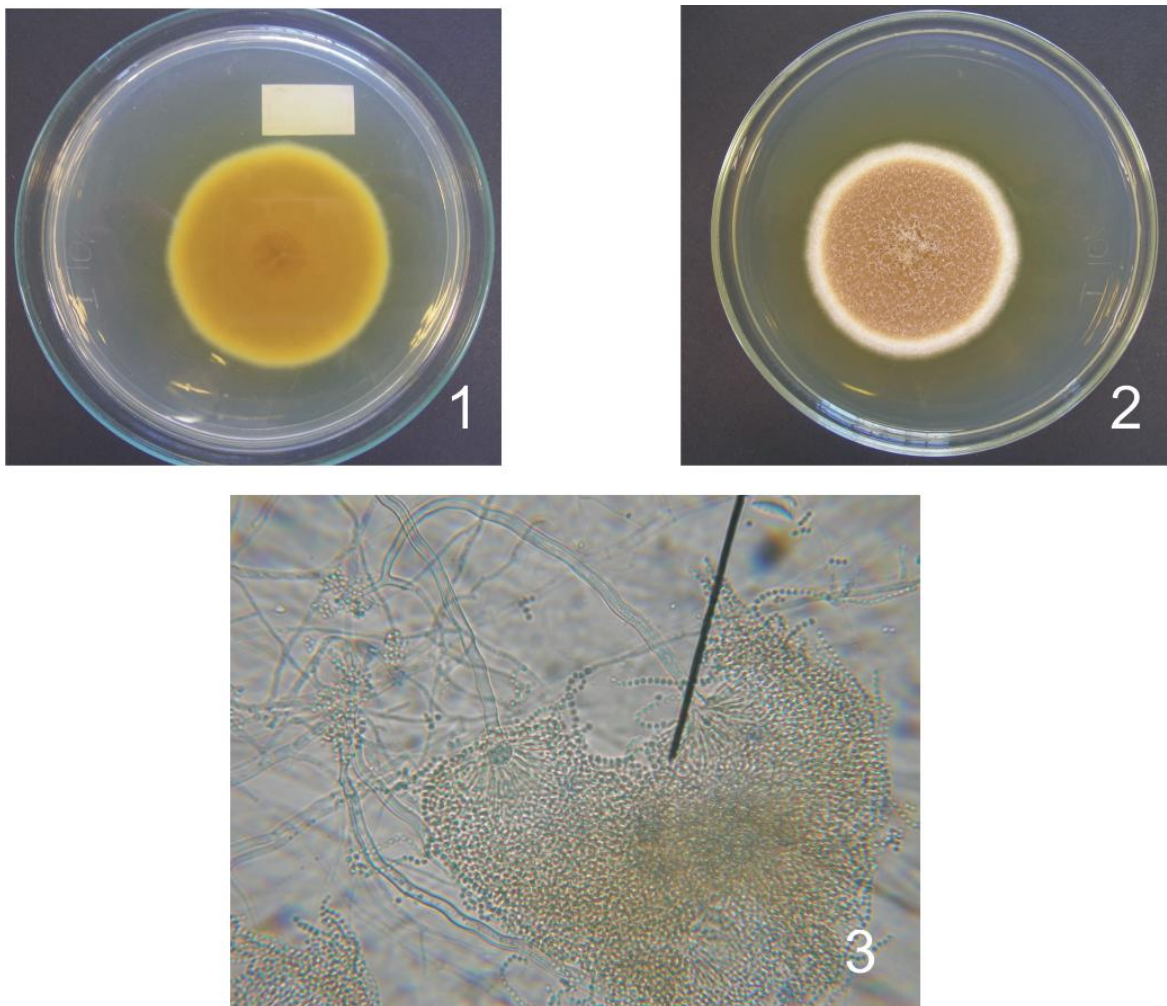


FIGURA 32 – *Fusarium* sp. isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

4 – Microscopia Eletrônica de Varredura de esporos em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 2000X.

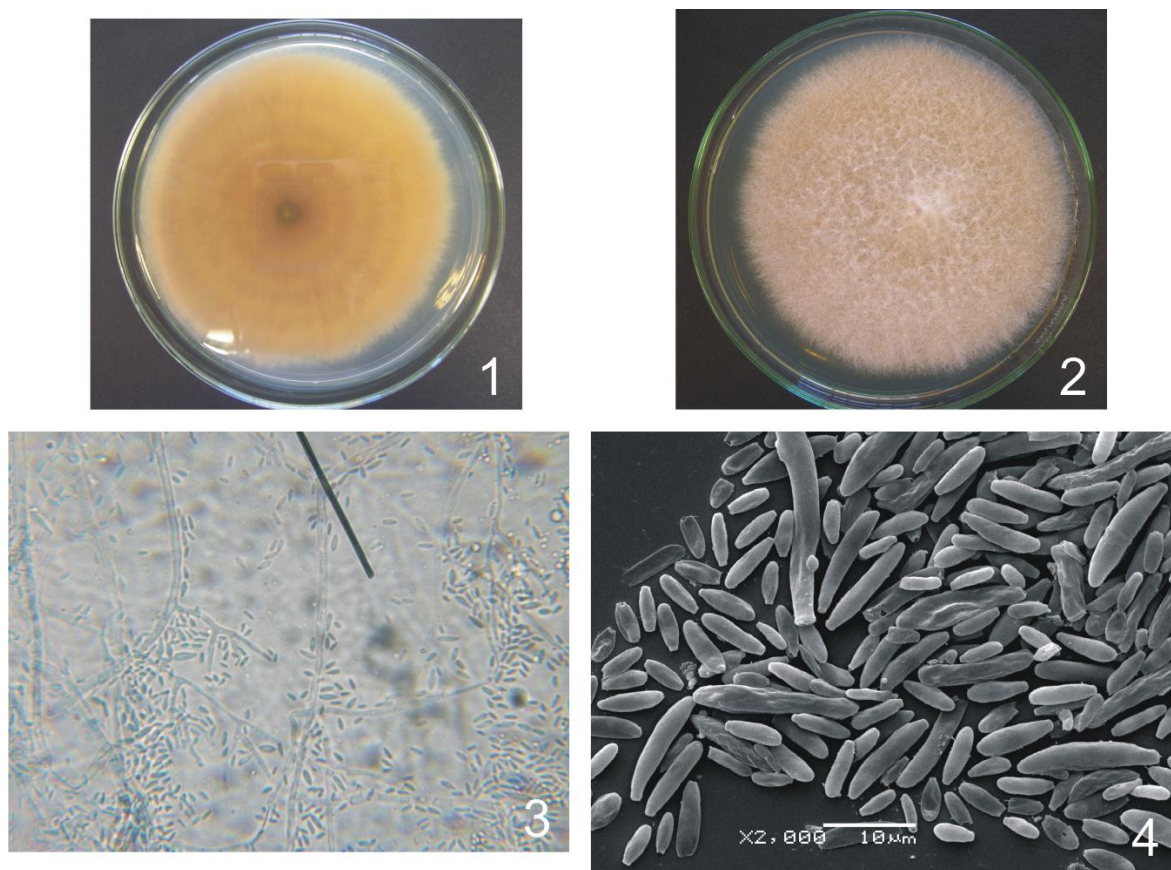


FIGURA 33 –*Mucor* sp1 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.

2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.

3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

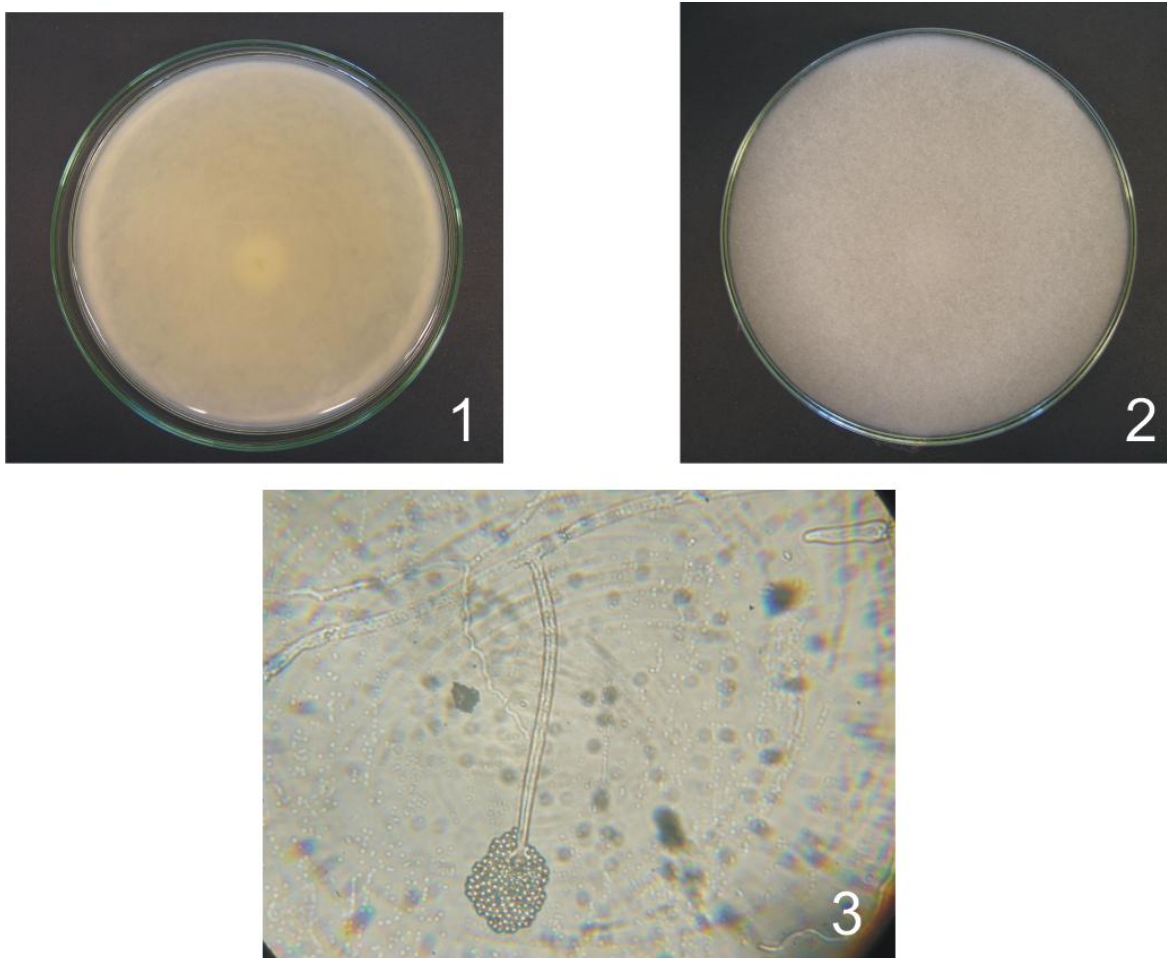


FIGURA 34 – *Mucor* sp2 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.

2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.

3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

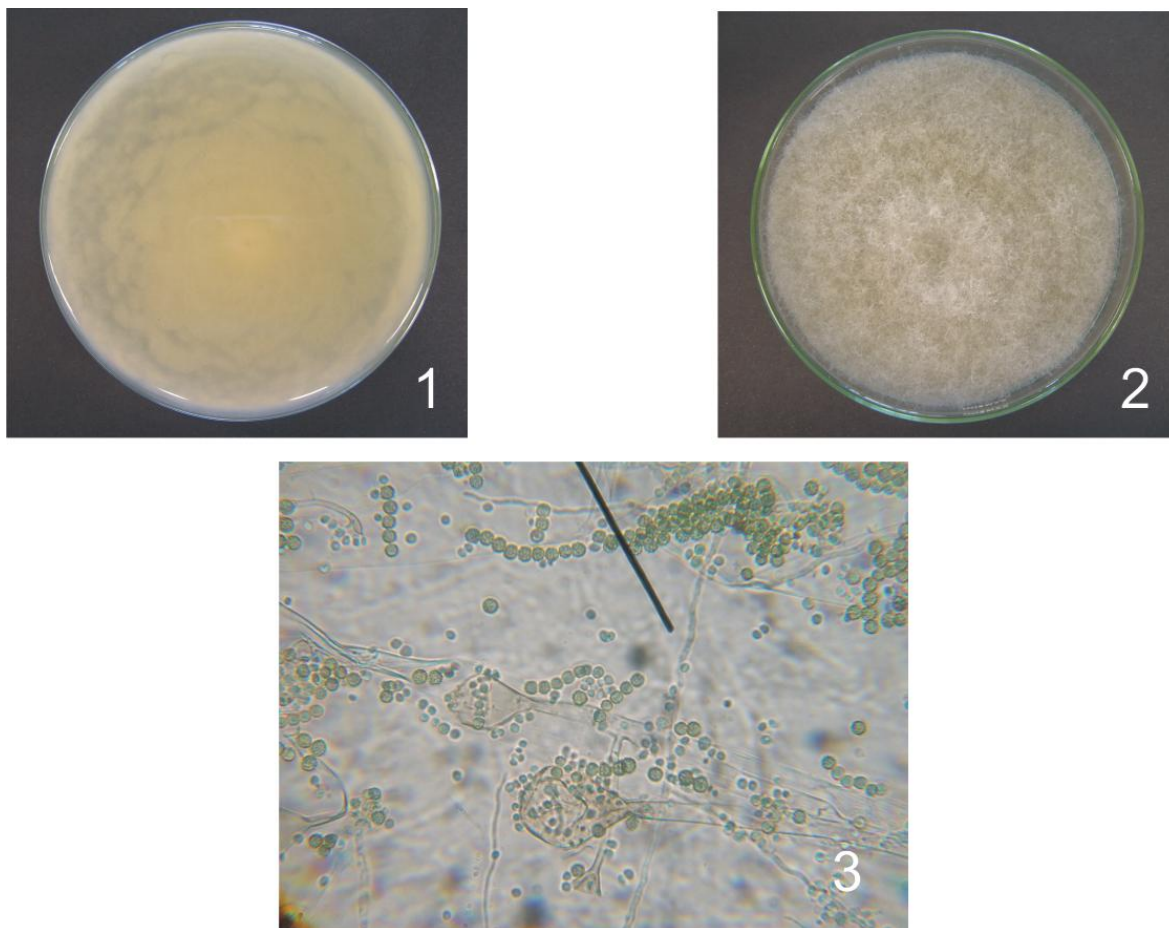


FIGURA 35 – *Paecilomyces* sp. isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.

2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.

3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

4 – Microscopia Eletrônica de Varredura de micélio e conidióforo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 2500X.

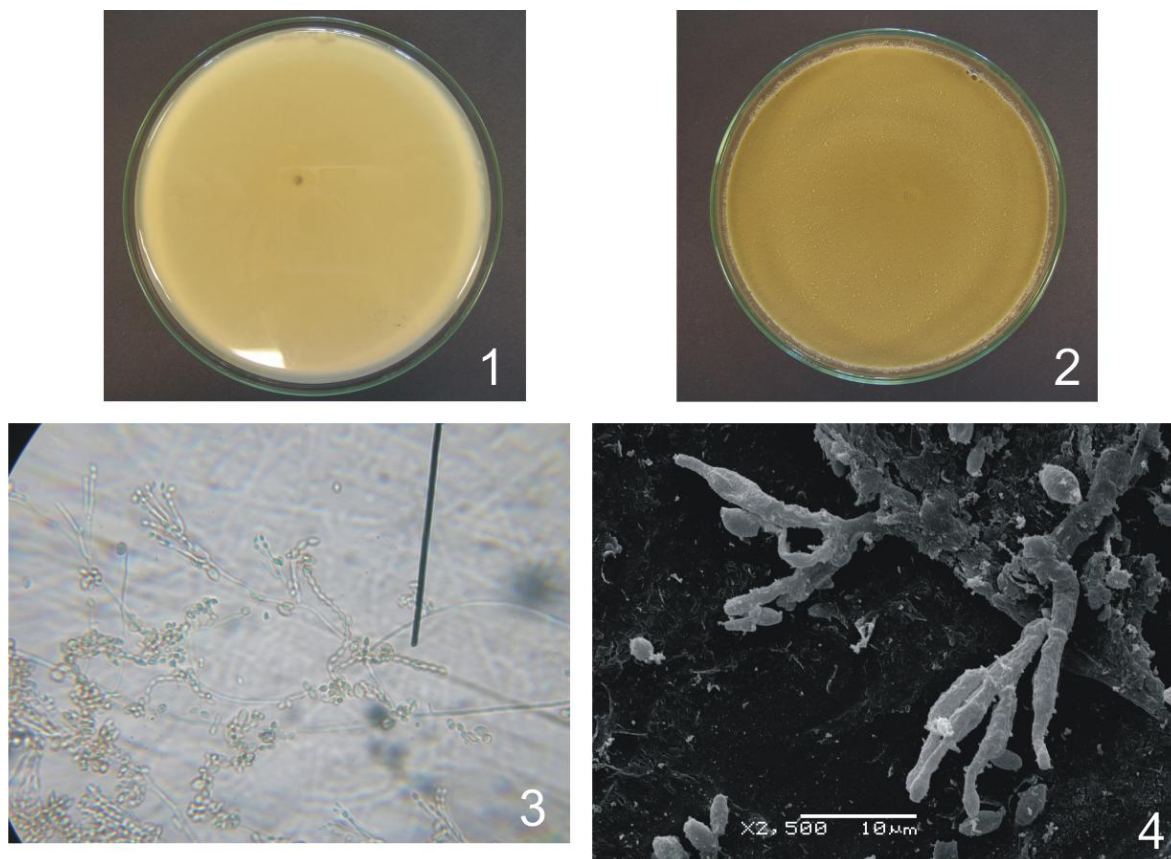


FIGURA 36 – *Penicillium* sp1 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.
- 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura de conidióforo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 4500X.

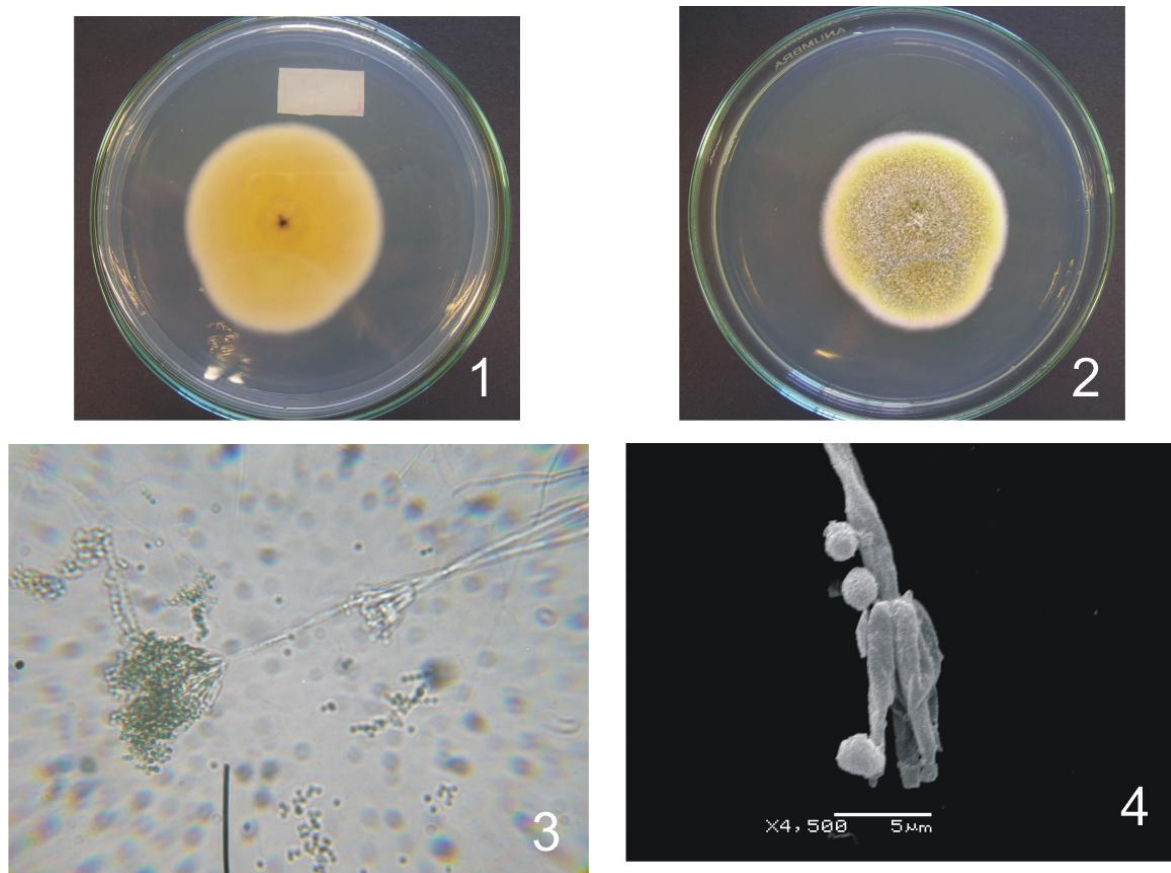


FIGURA 37 – *Penicillium* sp2 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.
- 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura de conidióforo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 6000X.

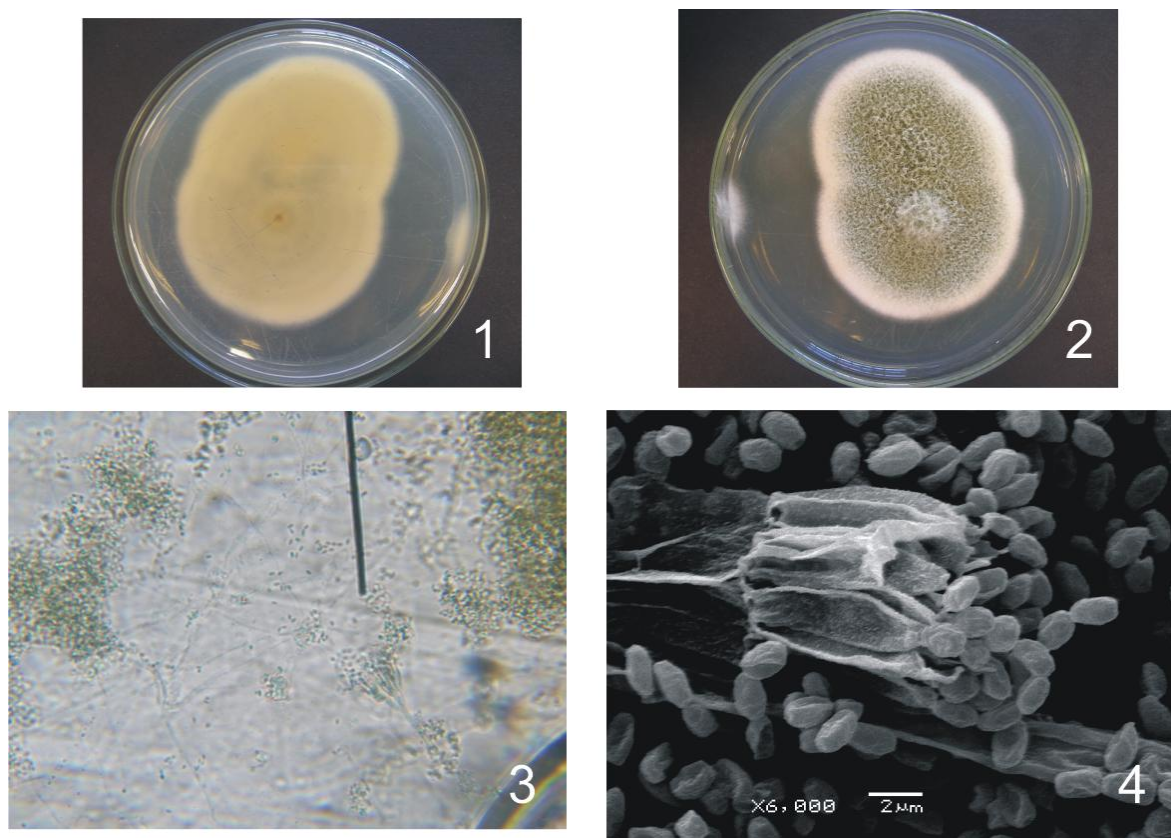


FIGURA 38 – *Penicillium* sp3 isolado de grãos de café cv. IAPAR 59.

- 1 – Morfologia colonial (reverso) em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 2 – Morfologia colonial em meio BDA, com 7 dias de crescimento.
- 3 – Micélio vegetativo em meio BDA e crescimento de 14 dias. Aumento de 400X.

